



## Bescheinigung

Die Hoechst Schering AgrEvo GmbH in Berlin/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Transgene Zellen und Pflanzen mit veränderter Aktivität des GBSSI- und des BE-Proteins"

am 12. August 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Der Firmenname der Anmelderin wurde geändert in: Aventis CorpScience GmbH.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol C 12 N 5/14 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 15. Mai 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 199 37 643.3

## Transgene Pflanzenzellen und Pflanzen mit veränderter Aktivität des GBSSI- und des BE-Proteins

### Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft transgene Pflanzenzellen und Pflanzen mit einer verringerten Aktivität eines GBSSI-Proteins und einer verringerten Aktivität eines BE-Proteins, insbesondere eines BE-Proteins, sowie Mittel und Verfahren zu deren Herstellung. Derartige Pflanzenzellen und Pflanzen können eine modifizierte Stärke synthetisieren, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie einen Amylopektin Gehalt von mindestens 90% und einen im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden Pflanzen des waxy-Phänotyps erhöhten Phosphatgehalt und/oder eine verringerte Verkleisterungstemperatur aufweist. Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch die von den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisierte Stärke sowie Verfahren zur Herstellung dieser Stärke. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung bestimmter Nucleinsäuremoleküle zur Herstellung von Pflanzen, die eine Stärke mit einem Amylopektin Gehalt von mindestens 90% synthetisieren, die im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden Pflanzen des waxy-Phänotyps einen erhöhten Phosphatgehalt und/oder eine verringerte Verkleisterungstemperatur aufweist.

Im Hinblick auf die zunehmende Bedeutung, die pflanzlichen Inhaltsstoffen als erneuerbaren Rohstoffquellen in letzter Zeit beigemessen wird, ist es eine der Aufgaben der biotechnologischen Forschung, sich um eine Anpassung dieser pflanzlichen Rohstoffe an die Anforderungen der verarbeitenden Industrie zu bemühen. Um eine Anwendung von nachwachsenden Rohstoffen in möglichst vielen Einsatzgebieten zu ermöglichen, ist es darüber hinaus erforderlich, eine große Stoffvielfalt zu erreichen. Neben Ölen, Fetten und Proteinen stellen Polysaccharide die wesentlichen nachwachsenden Rohstoffe aus Pflanzen dar. Eine zentrale Stellung bei den Polysacchariden nimmt neben Cellulose die Stärke ein, die einer der wichtigsten Speichersubstanzen in höheren Pflanzen ist. Hierbei ist Mais eine der interessantesten Pflanzen, da sie die weltweit für die Stärkeproduktion wichtigste Kulturpflanze ist.

Das Polysaccharid Stärke ist ein Polymer aus chemisch einheitlichen Grundbausteinen, den Glucosemolekülen. Es handelt sich dabei jedoch um ein sehr komplexes Gemisch aus unterschiedlichen Molekülformen, die sich hinsichtlich ihres Polymerisationsgrades und des Auftretens von Verzweigungen der Glucoseketten unterscheiden. Daher stellt Stärke keinen einheitlichen Rohstoff dar. Man unterscheidet insbesondere die Amylose-Stärke, ein im wesentlichen unverzweigtes Polymer aus  $\alpha$ -1,4-glycosidisch verknüpften Glucosemolekülen, von der Amylopektin-Stärke, die ihrerseits ein komplexes Gemisch aus unterschiedlich verzweigten Glucoseketten darstellt. Die Verzweigungen kommen dabei durch das Auftreten von zusätzlichen  $\alpha$ -1,6-glycosidischen Verknüpfungen zustande. In typischen für die Stärkeproduktion verwendeten Pflanzen, wie z.B. Mais oder Kartoffel, besteht die synthetisierte Stärke zu ca. 20% - 30% aus Amylose-Stärke und zu ca. 70% - 80% aus Amylopektin-Stärke.

Um eine möglichst breite Anwendung von Stärke zu ermöglichen, erscheint es wünschenswert, Pflanzen zur Verfügung zu stellen, die in der Lage sind, modifizierte Stärke zu synthetisieren, die sich für verschiedene Verwendungszwecke besonders eignet. Eine Möglichkeit, derartige Pflanzen bereitzustellen, besteht - neben züchterischen Maßnahmen - in der gezielten genetischen Veränderung des Stärkemetabolismus stärkeproduzierender Pflanzen durch gentechnologische Methoden.

Das Verhältnis von Amylopektin zu Amylose hat einen starken Einfluß auf die physico-chemischen Eigenschaften der Stärken und somit auf die jeweiligen Anwendungsmöglichkeiten dieser Stärken. Da Verfahren zur Trennung dieser beiden Komponenten sehr zeitaufwendig und kostenintensiv sind, werden derartige Verfahren großtechnisch nicht mehr angewendet (Young, A.H. in: Starch Chemistry and Technology, Eds. R. L. Whistler, J. N. BeMiller and E. F. Paschall, Academic Press, New York, 1984, 249-283). Für eine Vielzahl von Anwendungen wäre es somit wünschenswert, Stärken zur Verfügung zu haben, die nur noch eines der beiden Polymere enthalten.

Bisher sind sowohl Mutanten als auch durch gentechnologische Verfahren erzeugte Pflanzen beschrieben worden, die ein im Vergleich zu entsprechenden Wildtyppflanzen verändertes Amylopektin/Amylose-Verhältnis aufweisen. Beispielsweise produziert die sogenannte "waxy"-Mutante aus Mais, die eine Mutation im Gen codierend für die stärkekomplexbundene Stärkessynthase I (granule bound starch synthase I, abgekürzt: GBSSI) (Akasaka und Nelson, J. Biol. Chem., 241, (1966), 2280-2285; Shure et al., Cell 35 (1983), 225-233) aufweist, eine Stärke, die im wesentlichen aus Amylopektin besteht. Im Folgenden soll unter einer waxy-

Stärke eine Stärke mit einem Amylopektin Gehalt von mindestens 90% verstanden werden. Für Kartoffel wurden sowohl durch chemische Mutagenese einer haploiden Linie (Hovenkamp-Hermelink et al., Theor. Appl. Genet., 225, (1987), 217-221) als auch durch antisense-Inhibierung des Gens für die GBSSI Genotypen erzeugt, deren Stärken im wesentlichen aus Amylopektinstärke bestehen. Derartige waxy-Kartoffelstärken weisen im Vergleich zu Stärken aus entsprechenden Wildtyppflanzen keine Unterschiede hinsichtlich des Phosphatgehalts, in der Morphologie des Stärkekorns oder im Ionengehalt auf (Visser et al., Starch/Stärke, 49, (1997), 438-443).

Die funktionellen Eigenschaften der Stärke werden neben dem Amylose/Amylopektin-Verhältnis stark beeinflusst durch den Phosphatgehalt, das Molekulargewicht, das Muster der Seitenkettenverteilung, den Gehalt an Ionen, den Lipid- und Proteingehalt etc.. Als wichtige funktionelle Eigenschaften sind hierbei beispielsweise zu nennen die Löslichkeit, das Retrogradierungsverhalten, das Wasserbindungsvermögen, die Filmbildungseigenschaften, die Viskosität, die Verkleisterungseigenschaften, die Stabilität etc.. Auch die Stärkekorngröße kann für verschiedene Anwendungen von Bedeutung sein.

Der Phosphatgehalt läßt sich grundsätzlich sowohl durch gentechnische Ansätze (s. beispielsweise WO 97/11188; Safford et al., Carbohydrate Polymers 35, (1998), 155-168) als auch durch nachträgliche chemische Phosphorylierung (s. beispielsweise in: Starch Chemistry and Technology, Eds. R. L. Whistler, J. N. BeMiller and E. F. Paschall, Academic Press, New York, 1988, 349-364) modifizieren. Chemische Modifikationen sind jedoch in der Regel kosten- und zeintensiv.

Pflanzenzellen und Pflanzen, die waxy-Stärken mit im Vergleich zu Stärken aus entsprechenden Pflanzen(zellen) des waxy-Phänotyps erhöhtem Phosphatgehalt und/oder verringerter Verkleisterungstemperatur synthetisieren, konnten bisher nicht erzeugt werden. Auch Verfahren zur Herstellung derartiger Pflanzenzellen und Pflanzen sowie Verfahren zur Herstellung derartiger Stärken sind im Stand der Technik bisher nicht beschrieben.

Da der Phosphatgehalt der Stärken deren Eigenschaften beeinflußt, wäre es wünschenswert, Pflanzenzellen und Pflanzen zur Verfügung zu stellen, die waxy-Stärken mit im Vergleich zu entsprechenden Pflanzenzellen und Pflanzen des waxy-Phänotyps veränderten strukturellen und funktionellen Eigenschaften synthetisieren.

Somit liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, Pflanzenzellen und Pflanzen zur Verfügung zu stellen, welche im Vergleich zu entsprechenden Pflanzenzellen und Pflanzen des waxy-Phänotyps Stärken mit veränderten strukturellen und funktionellen Eigenschaften synthetisieren, sowie waxy-Stärke zur Verfügung zu stellen, welche sich in ihren strukturellen und funktionellen Eigenschaften von anderen waxy-Stärken unterscheiden und somit für allgemeine und/oder spezielle Verwendungszwecke besser geeignet ist.

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung transgene Pflanzenzellen, die genetisch modifiziert sind, wobei die genetische Modifikation zur Verringerung der Aktivität eines endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden GBSSI-Proteins und zur Verringerung der Aktivität eines endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden BE-Proteins führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyppflanzen.

Die genetische Modifikation kann dabei jede genetische Modifikation sein, die zu einer Verringerung der Aktivität eines endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden GBSSI-Proteins und eines BE-Proteins führt im Vergleich zu nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen entsprechender Wildtyppflanzen.

Der Begriff "transgen" bedeutet in diesem Zusammenhang, daß die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen aufgrund einer genetischen Modifikation, insbesondere der Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls oder mehrerer fremder Nucleinsäuremoleküle in ihrer genetischen Information von entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen abweichen.

Der Begriff "genetisch modifiziert" bedeutet dabei in diesem Zusammenhang, daß die Pflanzenzelle durch Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls oder mehrerer fremder Nucleinsäuremoleküle in ihrer genetischen Information verändert ist und daß das Vorhandensein oder die Expression des fremden Nucleinsäuremoleküls/der fremden Nucleinsäuremoleküle zu einer phänotypischen Veränderung führt. Phänotypische Veränderung bedeutet dabei vorzugsweise eine meßbare Veränderung einer oder mehrerer

Funktionen der Zellen. Beispielsweise zeigen genetisch modifizierte erfindungsgemäße Pflanzenzellen eine Verringerung der Expression eines endogenen GBSSI- und eines endogenen BE-Gens und/oder eine Verringerung der Aktivität des GBSSI-Proteins sowie eines BE-Proteins

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung transgene Pflanzenzellen, die genetisch modifiziert sind, wobei die genetische Modifikation zur Verringerung der Aktivität eines endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden GBSSI-Proteins und zur Verringerung der Aktivität eines endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden BEI-Proteins führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyppflanzen.

Entsprechend genetisch modifizierte erfindungsgemäße Pflanzenzellen zeigen eine Verringerung der Expression eines endogenen GBSSI- und eines endogenen BEI-Gens, und/oder eine Verringerung der Aktivität des GBSSI-Proteins sowie eines BEI-Proteins.

Unter dem Begriff "GBSSI-Protein" versteht man prinzipiell jedes Protein, das im Unterschied zur Klasse der löslichen Stärkesynthasen zur Klasse der stärkekomplexgebundenen Stärkesynthasen ("granule-bound starch synthases") Isoform I (=GBSSI, EC 2.4.1.21) gehört. Pflanzen, in denen die Enzymaktivität dieses Proteins stark oder vollkommen reduziert ist, synthetisieren eine (nahezu) amylosefreie, sogenannte waxy-Stärke (Shure et al., (1983) s.o.; Hovenkamp-Hermelink et al., (1987), s.o.; Visser et al., Mol. Gen. Genet., 225, (1991), 289-296), so daß diesem Enzym eine entscheidende Rolle bei der Synthese der Amylosestärke zugeschrieben wird. Nucleinsäuremoleküle, die für ein GBSSI-Protein codieren, sind für zahlreiche Pflanzen beschrieben worden, beispielsweise für Mais (Genbank Acc. No. AF079260, AF079261), Weizen (Genbank Acc. No. AB019622, AB019623, AB019624), Reis (Genbank Acc. No. AF092443, AF092444, AF031162), Kartoffel (Genbank Acc. No. X58453), Gerste (Genbank Acc. No. X07931, X07932). Mit Hilfe dieser bekannten Nucleinsäuremoleküle ist es dem Fachmann möglich nach Standardverfahren, beispielsweise durch heterologes Screening, entsprechende Sequenzen aus anderen Organismen, insbesondere pflanzlichen zu isolieren.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird unter einem Verzweigungsenzym oder BE-Protein ( $\alpha$ -1,4-Glucan:  $\alpha$ -1,4-Glucan 6-Glycosyltransferase, E.C. 2.4.1.18) ein Protein

verstanden, das eine Transglycosylierungsreaktion katalysiert, in der  $\alpha$ -1,4-Verknüpfungen eines  $\alpha$ -1,4-Glucan donors hydrolysiert und die dabei freigesetzten  $\alpha$ -1,4-Glucanketten auf eine  $\alpha$ -1,4-Glucanakzeptorkette transferiert und dabei in  $\alpha$ -1,6-Verknüpfungen überführt werden.

Der Begriff "BEI-Protein" bezeichnet ein Verzweigungsenzym (branching enzyme = BE) der Isoform I. Die Bezeichnung der Isoformen lehnt an der von Smith-White und Preiss vorgeschlagenen Nomenklatur an (Smith-White und Preiss, Plant Mol Biol. Rep. 12, (1994), 67-71, Larsson et al., Plant Mol Biol. 37, (1998), 505-511). Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung sollen alle Enzyme, die dem BEI-Protein aus Mais (Baba et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 181 (1), (1991), 87-94; Kim et al. Gene 216, (1998), 233-243) strukturell, d. h. auf Ebene der Aminosäuresequenz, ähnlicher sind als der BEI-Isoform des Proteins aus Mais (Genbank Acc. No. AF072725, U65948) als Isoform I bezeichnet werden. In Kartoffelpflanzen wird das BEI-Gen hauptsächlich in den Knollen und kaum in den Blättern exprimiert (Larsson et al., Plant Mol. Biol. 37, (1998), 505-511).

Nucleinsäuremoleküle, die für ein BEI-Protein codieren, sind für zahlreiche Pflanzen beschrieben worden, beispielsweise für Mais (Genbank Acc. No. D 11081, AF 072724), Reis (Genbank Acc. No. D11082), Kartoffel (verschiedene Formen des BEI-Gens(-Proteins) aus Kartoffel wurden beispielsweise beschrieben bei Khoshnoodi et al., Eur. J. Biochem. 242 (1), 148-155 (1996); Genbank Acc. No. Y 08786, Kosmann et al., Mol. Gen. Genet. 230, (1991), 39-44), Erbsen (Genbank Acc. No. X80010). Mit Hilfe dieser bekannten Nucleinsäuremoleküle ist es dem Fachmann möglich nach Standardverfahren, beispielsweise durch heterologes Screening, entsprechende Sequenzen aus anderen Organismen, insbesondere pflanzlichen zu isolieren.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung transgene Pflanzenzellen, die genetisch modifiziert sind, wobei die genetische Modifikation in der Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls oder mehrerer fremder Nucleinsäuremoleküle besteht, dessen/deren Vorhandensein oder dessen/deren Expression zur Verringerung der Aktivität eines GBSSI-Proteins und zur Verringerung der Aktivität eines BE-Proteins, vorzugsweise eines BEI-Proteins, führt/führen im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyppflanzen.

Die Herstellung derartiger erfindungsgemäßer Pflanzenzellen mit einer verringerten Aktivität eines GBSSI- und eines BE-Proteins kann durch verschiedene, dem Fachmann bekannte Verfahren erzielt werden, z.B. durch solche, die zu einer Inhibierung der Expression endogener Gene führen, die ein GBSSI-Protein bzw. ein BEI-Protein codieren. Hierzu zählen beispielsweise die Expression einer entsprechenden antisense-RNA, die Bereitstellung von Molekülen oder Vektoren, die einen Cosuppressionseffekt vermitteln, die Expression eines entsprechend konstruierten Ribozyms, das spezifisch Transkripte spaltet, die ein GBSSI-Protein bzw. ein BEI-Protein codieren, oder die sogenannte "in-vivo-Mutagenese". Alle diese Verfahren basieren auf der Einführung eines fremden oder mehrerer fremder Nucleinsäuremoleküle in das Genom von Pflanzenzellen.

Unter dem Begriff "fremdes Nucleinsäuremolekül" versteht man ein solches Molekül, das entweder natürlicherweise in entsprechenden Pflanzenzellen nicht vorkommt, oder das in der konkreten räumlichen Anordnung nicht natürlicherweise in den Pflanzenzellen vorkommt oder das an einem Ort im Genom der Pflanzenzelle lokalisiert ist, an dem es natürlicherweise nicht vorkommt. Bevorzugt ist das fremde Nucleinsäuremolekül ein rekombinantes Molekül, das aus verschiedenen Elementen besteht, deren Kombination oder spezifische räumliche Anordnung natürlicherweise in pflanzlichen Zellen nicht auftritt. Entsprechendes in der Mehrzahl gilt für den Begriff "mehrere fremde Nucleinsäuremoleküle".

Das fremde Nucleinsäuremolekül kann beispielsweise ein sogenanntes "Doppelkonstrukt" sein, worunter man einen einzigen Vektor zur Pflanzentransformation versteht, der sowohl die genetische Information zur Inhibierung der Expression eines endogenen GBSSI-Gens als auch zur Inhibierung der Expression des BE-Gens, vorzugsweise eines BEI-Gens, enthält oder dessen Vorhandensein bzw. dessen Expression zur Verringerung der Aktivität eines GBSSI- und eines BE-Proteins, vorzugsweise eines BEI-Proteins, führt.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird in das Genom der Pflanzenzelle nicht nur ein einziger spezifischer Vektor, sondern es werden mehrere unterschiedliche fremde Nucleinsäuremoleküle eingeführt, wobei eines dieser fremden Nucleinsäuremoleküle beispielsweise ein DNA-Molekül ist, das ein Cosuppressions-Konstrukt darstellt, das eine Verringerung der Expression von endogenen GBSSI-Genen bewirkt, und wobei ein weiteres fremdes Nucleinsäuremolekül beispielsweise ein DNA-Molekül ist, das eine andere antisense-RNA codiert, die eine Verringerung der Expression von endogenen BE-Genen, vorzugsweise BEI-Genen, bewirkt. Grundsätzlich ist bei der Konstruktion der fremden

Nucleinsäuremoleküle aber auch die Verwendung jeder anderen Kombination aus Antisense-, Cosuppressions- und Ribozymkonstrukten oder in-vivo-mutagenese denkbar, sofern diese Kombination zu einer gleichzeitigen Verringerung der Geneexpression endogener Gene, die für ein GBSSI- und ein BE-Protein, vorzugsweise ein BEI-Protein, codieren, oder sofern diese zu einer gleichzeitigen Verringerung der Aktivität eines GBSSI- und eines BE-Proteins, vorzugsweise eines BEI-Proteins, führen.

Die fremden Nucleinsäuremoleküle können hierbei zeitgleich oder auch nacheinander in das Genom der Pflanzenzelle eingeführt werden. Im ersten Falle spricht man von einer "Cotransformation", im letzten Falle von einer "Supertransformation".

Die genetische Information zur Verringerung der enzymatischen Aktivität des BE- bzw. BEI- und des GBSSI-Gens kann aber auch in einem "Doppelkonstrukt" enthalten sein.

In einer Ausführungsform der Erfindung wird zur Reduzierung der Aktivität eines GBSSI-Proteins und/oder eines BE-Proteins, vorzugsweise eines BEI-Proteins, in pflanzlichen Zellen mindestens eine antisense-RNA exprimiert.

Hierzu kann zum einen ein DNA-Molekül verwendet werden, das die gesamte für ein GBSSI-Protein und/oder ein BE-Protein, vorzugsweise ein BEI-Protein, codierende Sequenz einschließlich eventuell vorhandener flankierender Sequenzen umfaßt, als auch DNA-Moleküle, die nur Teile der codierenden Sequenz umfassen, wobei diese Teile lang genug sein müssen, um in den Zellen einen antisense-Effekt zu bewirken. Es können im allgemeinen Sequenzen bis zu einer Mindestlänge von 15 bp, vorzugsweise einer Länge von 100-500 bp, für eine effiziente antisense-Inhibition insbesondere Sequenzen mit einer Länge über 500 bp verwendet werden. In der Regel werden DNA-Moleküle verwendet, die kürzer als 5000 bp, vorzugsweise Sequenzen, die kürzer als 2500 bp sind.

Möglich ist auch die Verwendung von DNA-Sequenzen, die einen hohen Grad an Homologie zu den endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden Sequenzen haben, die ein GBSSI-Protein bzw. ein BE-Protein, vorzugsweise ein BEI-Protein, codieren. Die minimale Homologie sollte größer als ca. 65 % sein. Die Verwendung von Sequenzen mit Homologien zwischen 95 und 100 % ist zu bevorzugen.

Vorzugsweise wird die Verringerung der GBSSI- und/oder der BE-Aktivität, vorzugsweise der BEI-Aktivität, in den Pflanzenzellen durch einen Cosuppressionseffekt erzielt. Das Verfahren ist dem Fachmann bekannt und ist beispielsweise beschrieben in Jorgensen (Trends

Biotechnol. 8 (1990), 340-344). Niebel et al., (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 91-103), Flavell et al. (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 43-46), Palaqui und Vaucheret (Plant. Mol. Biol. 29 (1995), 149-159), Vaucheret et al., (Mol. Gen. Genet. 248 (1995), 311-317), de Borne et al. (Mol. Gen. Genet. 243 (1994), 613-621) und anderen Quellen.

Wie im Falle der oben beschriebenen antisense-Technologie können auch hier sowohl DNA-Moleküle verwendet werden, die für die gesamte codierende Region des GBSSI und/oder des BE-Proteins bzw. des BEI-Proteins codieren als auch DNA-Moleküle, die nur Teile der codierenden Sequenz umfassen.

Denkbar ist auch die Verwendung von DNA-Sequenzen, die einen hohen Grad an Homologie zu den endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden Sequenzen haben, die ein GBSSI-Protein und/oder ein BE-Protein bzw. ein BEI-Protein codieren. Die minimale Homologie sollte größer als ca. 65 % sein. Die Verwendung von Sequenzen mit Homologien zwischen 95 und 100 % ist zu bevorzugen. D.h., beispielsweise zur Inhibierung des BEI-Gens aus Kartoffel wird vorzugsweise eine DNA-Sequenz codierend für ein BEI-Protein aus Kartoffel (s.o.) verwendet, besonders bevorzugt ist in diesem Zusammenhang die Verwendung der von Kossmann et al. (s.o.) beschriebenen DNA-Sequenz.

Die Expression von Ribozymen zur Verringerung der Aktivität von bestimmten Enzymen in Zellen ist dem Fachmann bekannt und ist beispielsweise beschrieben in EP-B1 0321201. Die Expression von Ribozymen in pflanzlichen Zellen wurde z.B. beschrieben in Feyrer et al. (Mol. Gen. Genet. 250, (1996), 329-338).

Ferner kann die Verringerung der GBSSI- und/oder der BE-Aktivität, vorzugsweise der BEI-Aktivität, in den Pflanzenzellen auch durch die sogenannte "in vivo-Mutagenese" erreicht werden, bei der durch Transformation von Zellen ein hybrides RNA-DNA-Oligonucleotid ("Chimeroplast") in Zellen eingeführt wird (Kipp, P.B. et al., Poster Session beim "5th International Congress of Plant Molecular Biology, 21.-27. September 1997, Singapore, R. A. Dixon und C.J. Amazeen, Meeting report zu "Metabolic Engineering in Transgenic Plants", Keystone Symposia, Copper Mountain, CO, USA, TIBTECH 15, (1997), 441-447, internationale Patentanmeldung WO 9515972; Kren et al., Hepatology 25, (1997), 1462-1468; Cole-Strauss et al., Science 273, (1996), 1386-1389).

Ein Teil der DNA-Komponente des RNA-DNA-Oligonucleotids ist homolog zu einer Nucleinsäuresequenz eines endogenen GBSSI-Gens und/oder BE-Gens bzw. BEI-Gens, weist jedoch im Vergleich zur Nucleinsäuresequenz des endogenen GBSSI-Gens und/oder BE- bzw. BEI-Gens eine Mutation auf oder enthält eine heterologe Region, die von den homologen Regionen umschlossen ist.

Durch Basenpaarung der homologen Regionen des RNA-DNA-Oligonucleotids und des endogenen Nucleinsäuremoleküls, gefolgt von homologer Rekombination kann die in der DNA-Komponente des RNA-DNA-Oligonucleotids enthaltene Mutation oder heterologe Region in das Genom einer Pflanzenzelle übertragen werden. Dies führt zu einer Verringerung der Aktivität eines GBSSI-Proteins und/oder eines BE-Proteins bzw. eines BEI-Proteins. Ferner ist dem Fachmann bekannt, daß er die Aktivität eines GBSSI-Proteins und/oder eines BE-Proteins bzw. eines BEI-Proteins durch die Expression von nicht-funktionellen Derivaten insbesondere trans-dominanten Mutanten solcher Proteine und/oder durch die Expression von Antagonisten/Inhibitoren solcher Proteine erreichen kann. Antagonisten/Inhibitoren solcher Proteine umfassen beispielsweise Antikörper, Antikörperfragmente oder Moleküle mit ähnlichen Bindungseigenschaften. Beispielsweise wurde ein cytoplasmatischer scFv Antikörper eingesetzt um die Aktivität des Phytochrom A Proteins in gentechnisch veränderten Tabakpflanzen zu modulieren (Owen, Bio/Technology 10 (1992), 790-4; Review: Franken, E, Teuschel, U. und Hain, R., Current Opinion in Biotechnology 8, (1997), 411-416; Whitelam, Trends Plant Sci. 1 (1996), 268-272).

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher insbesondere auch transgene Pflanzenzellen.

- a) die mindestens ein DNA-Molekül enthalten, das zur Synthese mindestens einer antisense-RNA führen kann, welche eine Verringerung der Expression von endogenen Genen, die ein GBSSI- und/oder ein BE-Protein, vorzugsweise ein BEI-Protein, codieren, bewirkt;
- b) die mindestens ein DNA-Molekül enthalten, das über einen Cosuppressionseffekt zu einer Verringerung der Expression von endogenen Genen, die ein GBSSI- und/oder ein BE-Protein, vorzugsweise ein BEI-Protein, codieren, führt.
- c) die mindestens ein DNA-Molekül enthalten, das zur Synthese mindestens eines Ribozyms führen kann, welches spezifisch Transkripte von endogenen Genen, die ein GBSSI- und/oder ein BE-Protein, vorzugsweise ein BEI-Protein, codieren, spalten kann; und/oder

d) die aufgrund einer in-vivo-Mutagenese eine Mutation oder eine Insertion einer heterologen DNA-Sequenz in mindestens einem endogenen, ein GBSSI-Protein und/oder ein BE-Protein, vorzugsweise ein BEI-Protein, codierendem Gen aufweisen, wobei die Mutation oder Insertion eine Verringerung der Expression des GBSSI-Gens und/oder des BE-Gens, vorzugsweise des BEI-Gens, bewirkt, oder die Synthese eines inaktiven GBSSI-Proteins und/oder eines inaktiven BE-Proteins bzw. eines inaktiven BEI-Proteins.

Der Begriff "Verringerung der Aktivität" bedeutet dabei im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Verringerung der Expression endogener Gene, die ein GBSSI- und ein BE-Protein, vorzugsweise ein BEI-Protein, codieren, eine Verringerung der Menge an GBSSI- und BE-Protein, vorzugsweise BEI-Protein, in den Zellen und/oder eine Verringerung der enzymatischen Aktivität des GBSSI- und des BE-Proteins, vorzugsweise des BEI-Protein, in den Zellen.

Die Verringerung der Expression kann beispielsweise bestimmt werden durch Messung der Menge an GBSSI- und BE-Protein bzw. BEI-Protein codierenden Transkripten, z.B. durch Northern-Blot-Analyse. Eine Verringerung bedeutet dabei vorzugsweise eine Verringerung der Menge an Transkripten im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Zellen um mindestens 50%, bevorzugt um mindestens 70%, besonders bevorzugt um mindestens 85% und besonders bevorzugt um mindestens 95%.

Die Verringerung der Menge an GBSSI- und BE- bzw. BEI-Protein kann beispielsweise bestimmt werden durch Western-Blot-Analyse. Eine Verringerung bedeutet dabei vorzugsweise eine Verringerung der Menge an GBSSI- und BE- bzw. BEI-Protein im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Zellen um mindestens 50%, bevorzugt um mindestens 70%, besonders bevorzugt um mindestens 85% und besonders bevorzugt um mindestens 95%.

Die Verringerung der enzymatischen Aktivität des GBSSI-Proteins kann beispielsweise bestimmt werden durch die von Kuipers et al., Plant Mol. Biol., 26 (1994), 1759-1773 beschriebene Methode. Die Verringerung der enzymatischen Aktivität des BE-Proteins kann bestimmt werden durch die von Safford et al., Carbohydrate Polymers 35, (1998), 155-168 beschriebene Methode. Eine Verringerung der enzymatischen Aktivität im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Zellen bedeutet dabei vorzugsweise eine Verringerung um mindestens 50%, bevorzugt um mindestens 70%, besonders bevorzugt um mindestens 85% und besonders bevorzugt um mindestens 95%.

Die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen synthetisieren eine modifizierte Stärke, die beispielsweise in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, insbesondere dem Amylose/Amylopektin-Verhältnis, dem Verzweigungsgrad, der durchschnittlichen Kettenlänge, dem Phosphatgehalt, dem Viskositätsverhalten, der Stärkekorngröße und/oder der Stärkekornform im Vergleich zu in Wildtyppflanzen synthetisierter Stärke verändert sein kann, so daß diese für spezielle Verwendungszwecke besser geeignet ist.

Es wurde überraschenderweise gefunden, daß bei Pflanzenzellen, bei denen die Aktivität des GBSSI- und des BEI-Proteins verringert ist, die Zusammensetzung der Stärke in der Weise verändert ist, daß sie nicht nur durch einen Amylopektingehalt von mindestens 90%, sondern zusätzlich auch durch einen erhöhten Phosphatgehalt im Vergleich zu Pflanzenzellen von entsprechenden Pflanzen des waxy-Phänotyps gekennzeichnet ist. Dieser erhöhte Phosphatgehalt wirkt sich auf die funktionellen Eigenschaften der Stärke aus, so daß diese für spezielle Verwendungszwecke besser geeignet ist.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch transgene Pflanzenzellen, die eine modifizierte Stärke mit einem Amylopektingehalt von mindestens 90%, bevorzugt von mindestens 93%, besonders bevorzugt von mindestens 95% und insbesondere bevorzugt von mindestens 97% enthalten und im Vergleich zu Stärke aus Pflanzenzellen von entsprechenden Pflanzen des waxy-Phänotyps einen erhöhten Phosphatgehalt aufweisen.

Der Amylopektingehalt kann dabei nach der in den Beispielen für Kartoffelstärke beschriebenen Methode von Hovenkamp-Hermelink et al. (Potato Research 31, (1988), 241-246) bestimmt werden. Diese Methode ist auch auf isolierte Stärken anderer Pflanzenspezies anwendbar. Verfahren zur Isolierung von Stärken sind dem Fachmann bekannt.

Der Begriff "erhöhter Phosphatgehalt" bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, daß der Gesamtgehalt an kovalent gebundenem Phosphat und/oder der Gehalt an Phosphat in C-6-Position der in den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen synthetisierten Stärke um mindestens 30%, bevorzugt um mindestens 50%, besonders bevorzugt um mindestens 75%, insbesondere um mindestens 100% im Vergleich zu Pflanzenzellen von entsprechenden Pflanzen des waxy-Phänotyps erhöht ist.

Die Bestimmung des Gesamt-Phosphatgehalts bzw. des Gehalts an Phosphat in C-6-Position kann nach der unten beschriebenen Methode erfolgen.

Unter dem Begriff "entsprechende Pflanzen des waxy-Phänotyps" sollen im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung vergleichbare Pflanzen verstanden werden, vorzugsweise Pflanzen der gleichen Ursprungssorte, d.h., der Sorte aus der die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen durch Einführung der oben beschriebenen genetischen Modifikation hervorgegangen sind. Ferner enthalten Pflanzen des waxy-Phänotyps Pflanzenzellen, die eine Stärke mit einem Amylopektin Gehalt von mindestens 90%, bevorzugt von mindestens 93%, besonders bevorzugt von mindestens 95% und insbesondere bevorzugt von mindestens 97% synthetisieren. Des weiteren sind Pflanzen des waxy-Phänotyps dadurch gekennzeichnet, daß sie eine verringerte enzymatische Aktivität des GBSSI-Proteins im Vergleich zu Pflanzenzellen von Wildtyppflanzen aufweisen.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung auch transgene Pflanzenzellen, die eine modifizierte Stärke mit einem Amylopektin Gehalt von mindestens 90%, bevorzugt von mindestens 93%, besonders bevorzugt von mindestens 95% und insbesondere bevorzugt von mindestens 97% enthalten, im Vergleich zu Stärke aus Pflanzenzellen von entsprechenden Pflanzen des waxy-Phänotyps einen erhöhten Phosphatgehalt aufweisen und/oder eine im Vergleich zu Stärken aus Pflanzenzellen oder entsprechenden Pflanzen des waxy-Phänotyps eine verringerte Verkleisterungstemperatur aufweisen.

Unter der Verkleisterungstemperatur soll im Rahmen der vorliegenden Erfindung die Temperatur T verstanden werden, die sich aus einem Viskositätsprofil ermitteln läßt (s. Figur 1), das mittels eines Rapid Visco Analyzers (RVA) (Newport Scientific Pty Ltd, Investment Support Group, Warriewood, NSW 2102, Australien) gewonnen werden kann. Die Erstellung des Viskositätsprofils erfolgt dabei nach dem unten beschriebenen Protokoll. Die Verkleisterungstemperatur bezeichnet diejenige Temperatur, bei der die Viskosität aufgrund der Quellung der Stärkekörner beginnt signifikant anzusteigen. Die Bestimmung der Verkleisterungstemperatur erfolgt über die Steigung der Viskositätskurve in Abhängigkeit von der Zeit. Wird die Steigung der Kurve größer als 1,2 (dieser Wert wird vom Benutzer am

RVA-Gerät vorgegeben), identifiziert das Computerprogramm die zu diesem Zeitpunkt gemessene Temperatur als Verkleisterungstemperatur.

Der Begriff "verringerte Verkleisterungstemperatur" bedeutet dabei, daß die Verkleisterungstemperatur im Vergleich zu Stärken aus Pflanzenzellen von entsprechenden Pflanzen des waxy-Phänotyps um mindestens 0,5°C, bevorzugt um mindestens 1,5°C, besonders bevorzugt um mindestens 3°C und insbesondere bevorzugt um mindestens 5°C verringert ist.

Die Beobachtung, daß die Stärken der erfindungsgemäßen Pflanzenzellen eine im Vergleich zu Stärken aus Pflanzenzellen von entsprechenden Pflanzen des waxy-Phänotyps verringerte Verkleisterungstemperatur aufweisen, ist insbesondere deshalb überraschend, weil Safford et al (Carbohydrate Polymers 35, (1998), 155-168) zeigen konnten, daß ein im Vergleich zu Stärken aus Wildtyppflanzen erhöhter Phosphatgehalt, der durch eine antisense-Inhibierung eines BEI-Proteins in Kartoffelpflanzen hervorgerufen werden kann, zu Stärken mit einer erhöhten "viscosity onset temperature" führt. Die "viscosity onset temperature" ist eine der Verkleisterungstemperatur verwandte Größe, die im Unterschied zur Verkleisterungstemperatur auf der Methode der "Differential Scanning Calorimetry" (=DSC) beruht.

Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung der DNA mittels des biolistischen Ansatzes sowie weitere Möglichkeiten.

Die Verwendung der Agrobakterien-vermittelten Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120516; Hoekema, IN: The Binary Plant Vector System Offsedrukkerij Kanters B.V., Ablasserdam (1985), Chapter V, Fraley et al., Crit. Rev. Plant Sci. 4, 1-46 und An et al. EMBO J. 4, (1985), 277-287 beschrieben worden. Für die Transformation von Kartoffel, siehe z.B. Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8, (1989), 29-33).

Auch die Transformation monokotyler Pflanzen mittels Agrobakterium basierender Vektoren wurde beschrieben (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22, (1993), 491-506; Hiei et al., Plant J. 6, (1994) 271-282; Deng et al., Science in China 33, (1990), 28-34; Wilnink et al., Plant Cell



Reports 11, (1992), 76-80; May et al., Bio/Technology 13, (1995), 486-492; Conner und Domisse, Int. J. Plant Sci. 153 (1992), 550-555; Ritchie et al., Transgenic Res. 2, (1993), 252-265). Alternatives System zur Transformation von monokotylen Pflanzen ist die Transformation mittels des biolischen Ansatzes (Wan und Lemaux, Plant Physiol. 104, (1994), 37-48; Vasil et al., Bio/Technology 11 (1993), 1553-1558; Ritala et al., Plant Mol. Biol. 24, (1994), 317-325; Spencer et al., Theor. Appl. Genet. 79, (1990), 625-631), die Protoplastentransformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, die Einbringung von DNA mittels Glasfasern. Insbesondere die Transformation von Mais wird in der Literatur mehrfach beschrieben (vgl. z. B. WO 95/06128, EP 0513849, EP 0465875, EP 292435; Fromm et al., Biotechnology 8, (1990), 833-844; Gordon-Kamm et al., Plant Cell 2, (1990), 603-618; Kozel et al., Biotechnology 11 (1993), 194-200; Moroc et al., Theor. Appl. Genet. 80, (1990), 721-726).

Auch die erfolgreiche Transformation anderer Getreidearten wurde bereits beschrieben, z.B. für Gerste (Wan und Lemaux, s.o.; Ritala et al., s.o.; Kems et al., Nature 296, (1982), 72-74) und für Weizen (Nehra et al., Plant J. 5, (1994), 285-297).

Generell kommt für die Expression des fremden Nucleinsäuremoleküls (der fremden Nucleinsäuremoleküle) jeder in pflanzlichen Zellen aktive Promotor in Frage. Der Promotor kann dabei so gewählt sein, daß die Expression in den erfindungsgemäßen Pflanzen konstitutiv erfolgt oder nur in einem bestimmten Gewebe, zu einem bestimmten Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung oder zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt. In Bezug auf die Pflanze kann der Promotor homolog oder heterolog sein.

Sinnvolle Promotoren sind z.B. der Promotor der 35S RNA des Cauliflower Mosaic Virus und der Ubiquitin-Promotor aus Mais für eine konstitutive Expression, der Palatingen-Promotor B33 (Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) für eine knollenspezifische Expression in Kartoffeln oder ein Promotor, der eine Expression lediglich in photosynthetisch aktiven Geweben sicherstellt, z.B. der ST-LSI-Promotor (Stockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7943-7947; Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445-2451), der *Cu<sup>b</sup>*-Promotor (s. beispielsweise US 5656496, US 5639952, Bansal et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, (1992), 3654-3658) und der Rubisco SSU-Promotor (s. beispielsweise US 5034322, US 4962028) oder für eine endosperm-spezifische Expression der Glutelin-Promotor (Leisy et al., Plant Mol. Biol. 14, (1990), 41-50; Zheng et al., Plant J. 4, (1993), 357-366; Yoshinaka et al., FEBS Lett. 383, (1996), 213-218), der Shunkun-1 Promotor (Wert et al., EMBO J. 4, (1985), 1373-1380), der HM-G-Promotor aus Weizen, der USP-Promotor,

der Phaseolinpromotor oder Promotoren von Zein-Genen aus Mais (Pedersen et al., Cell 29, (1982), 1015-1026; Quatrocio et al., Plant Mol. Biol. 15 (1990), 81-93).

Die Expression des fremden Nucleinsäuremoleküls (der fremden Nucleinsäuremoleküle) ist insbesondere in solchen Organen der Pflanze von Vorteil, die Stärke speichern. Solche Organe sind z.B. die Knolle der Kartoffelpflanze oder die Körner bzw. das Endosperm von Mais-, Weizen- oder Reispflanzen. Bevorzugt werden daher Promotoren verwendet, die die Expression in diesen Organen vermitteln.

Es können jedoch auch Promotoren verwendet werden, die nur zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt aktiviert werden (siehe beispielsweise WO 93/07279). Von besonderem Interesse können hierbei Promotoren von heat-shock Proteinen sein, die eine einfache Induktion erlauben. Ferner können samenspezifische Promotoren, wie z.B. der USP-Promotor aus *Vicia faba*, der eine samenspezifische Expression in *Vicia faba* und anderen Pflanzen gewährleistet (Fiedler et al., Plant Mol. Biol. 22, (1993), 669-679; Baumlein et al., Mol. Gen. Genet. 225, (1991), 459-467). Ferner können auch fruchtspezifische Promotoren eingesetzt werden, wie z.B. beschrieben in der WO 91/01373.

Ferner kann eine Terminationsequenz vorhanden sein, die der korrekten Beendigung der Transkription dient sowie der Addition eines Poly-A-Schwanzes an das Transkript, dem eine Funktion bei der Stabilisierung der Transkripte beigemessen wird. Derartige Elemente sind in der Literatur beschrieben (vgl. z.B. Gielen et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) und sind beliebig austauschbar.

Die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen können zu jeder beliebigen Pflanzenspezies gehören, d.h. sowohl zu monokotylen als auch zu dikotylen Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um Pflanzenzellen aus landwirtschaftlichen Nutzpflanzen, d.h. aus Pflanzen, die vom Menschen kultiviert werden für Zwecke der Ernährung oder für technische, insbesondere industrielle Zwecke. Vorzugsweise betrifft die Erfindung faserbildende (z.B. Flachs, Hanf, Baumwolle), ölspichernde (z.B. Raps, Sonnenblume, Sojabohne), zuckerspeichernde (z.B. Zuckerrübe, Zuckerrohr, Zuckerrübe) und proteinspeichernde Pflanzen (z.B. Leguminosen). In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung Futterpflanzen (z.B. Futter- und Weidegräser (Alfalfa, Klee etc.)), Gemüsepflanzen (z.B. Tomate, Salat, Chicoree). In einer besonders bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung Pflanzenzellen aus stärke-speichernden Pflanzen (z.B. Weizen, Gerste, Hafer, Roggen, Kartoffel, Mais, Reis, Erbsen, Maniok), insbesondere bevorzugt sind Pflanzenzellen aus Kartoffel.

Die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen können zur Regeneration ganzer Pflanzen verwendet werden.

Die durch Regeneration der erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen erhältlichen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ferner sind Gegenstand der Erfindung Pflanzen, die die oben beschriebenen transgenen Pflanzenzellen enthalten. Bei den transgenen Pflanzen kann es sich prinzipiell um Pflanzen jeder beliebigen Pflanzenspezies handeln, d.h. sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um Nutzpflanzen, d.h. Pflanzen, die vom Menschen kultiviert werden für Zwecke der Ernährung oder für technische, insbesondere industrielle Zwecke. Vorzugsweise betrifft die Erfindung Pflanzenzellen aus faserbildenden (z.B. Flachs, Hanf, Baumwolle), ölspeichernden (z.B. Raps, Sonnenblume, Sojabohne), zuckerspeichernden (z.B. Zuckerrübe, Zuckerrohr, Zuckerrhise) und proteinspeichernden Pflanzen (z.B. Leguminosen).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung Futterpflanzen (z.B. Futter- und Weidegräser (Alfalfa, Klee etc.)), Gemüsepflanzen (z.B. Tomate, Salat, Chicoree). In einer besonders bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung stärke-speichernde Pflanzen (z.B. Weizen, Gerste, Hafer, Roggen, Kartoffel, Mais, Reis, Erbse, Maniok), insbesondere bevorzugt sind Kartoffelpflanzen.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanze, die eine modifizierte Stärke synthetisiert, wobei

(a) eine pflanzliche Zelle genetisch modifiziert wird durch die Einführung eines oder mehrerer fremder Nucleinsäuremolekül(s)e, deren/dessen Vorhandensein oder deren/dessen Expression zur Verringerung der Aktivität eines Proteins mit der Aktivität eines GBSSI-Proteins und zur Verringerung der Aktivität eines Proteins mit der Aktivität eines BEI-Proteins führt/führen;

(b) aus der gemäß a) hergestellten Zelle eine Pflanze regeneriert wird; und  
aus der gemäß Schritt b) erzeugten Pflanze gegebenenfalls weitere Pflanzen erzeugt werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanze, deren Stärke einen Amylopektin-gehalt von mindestens 90% und einen erhöhten Phosphat-gehalt im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden Pflanzen des waxy-Phänotyps aufweist, wobei

(c) eine pflanzliche Zelle genetisch modifiziert wird durch die Einführung eines oder mehrerer fremder Nucleinsäuremolekül(s)e, deren/dessen Vorhandensein oder deren/dessen Expression zur Verringerung der Aktivität eines Proteins mit der Aktivität eines GBSSI-Proteins und zur Verringerung der Aktivität eines Proteins mit der Aktivität eines BEI-Proteins führt/führen;

(d) aus der gemäß a) hergestellten Zelle eine Pflanze regeneriert wird; und  
aus der gemäß Schritt b) erzeugten Pflanze gegebenenfalls weitere Pflanzen erzeugt werden.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanze, deren Stärke einen Amylopektin-gehalt von mindestens 90% und die einen erhöhten Phosphat-gehalt und/oder eine verringerte Verkleisterungstemperatur T im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden Pflanzen des waxy-Phänotyps aufweist, wobei

(a) eine pflanzliche Zelle genetisch modifiziert wird durch die Einführung eines oder mehrerer fremder Nucleinsäuremolekül(s)e, deren/dessen Vorhandensein oder deren/dessen Expression zur Verringerung der Aktivität eines Proteins mit der Aktivität eines GBSSI-Proteins und zur Verringerung der Aktivität eines Proteins mit der Aktivität eines BEI-Proteins führt/führen;

(b) aus der gemäß a) hergestellten Zelle eine Pflanze regeneriert wird; und  
aus der gemäß Schritt b) erzeugten Pflanze gegebenenfalls weitere Pflanzen erzeugt werden.

Die Begriffe "erhöhter Phosphat-gehalt" bzw. "verringerte Verkleisterungstemperatur" werden in diesem Zusammenhang wie bereits oben definiert.

Für die laut Schritt a) eingeführte genetische Modifikation gilt dasselbe, was bereits oben in anderem Zusammenhang mit den erfindungsgemäßen Pflanzen erläutert wurde.

Die Regeneration von Pflanzen gemäß Schritt b) kann nach dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen.

Die Erzeugung weiterer Pflanzen gemäß Schritt b) der erfindungsgemäßen Verfahren kann z.B. erfolgen durch vegetative Vermehrung (beispielsweise über Stecklinge, Knollen oder über Calluskultur und Regeneration ganzer Pflanzen) oder durch sexuelle Vermehrung. Die sexuelle Vermehrung findet dabei vorzugsweise kontrolliert statt, d.h. es werden ausgewählte Pflanzen mit bestimmten Eigenschaften miteinander gekreuzt und vermehrt. Natürlich ist dem Fachmann bekannt, daß er zur Herstellung der erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und

Pflanzen auch transgene Pflanzen verwenden kann, bei denen bereits die Aktivität eines der vorgenannten Proteine verringert ist und die gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren lediglich nur noch insoweit genetisch modifiziert werden müssen, daß die Aktivität des zweiten Proteins ebenfalls verringert wird.

Ferner ist dem Fachmann bekannt, daß die oben beschriebene Superttransformation nicht unbedingt bei Primärtransformatanten durchgeführt wird, sondern vorzugsweise bei zuvor ausgewählten stabilen transgenen Pflanzen, die vorteilhafterweise bereits durch entsprechende Experimente auf beispielsweise Fertilität, stabile Expression des Fremdgens, Hemi- und Homozygotie etc. getestet wurden.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die durch die erfindungsgemäßen Verfahren erhältlichen Pflanzen.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch Vermehrungsmaterial erfindungsgemäßer Pflanzen sowie der gemäß den erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten transgenen Pflanzen. Der Begriff Vermehrungsmaterial umfaßt dabei jene Bestandteile der Pflanze, die geeignet sind zur Erzeugung von Nachkommen auf vegetativem oder generativem Weg. Für die vegetative Vermehrung eignen sich beispielsweise Stecklinge, Calluskulturen, Rhizome oder Knollen. Anderes Vermehrungsmaterial umfaßt beispielsweise Früchte, Samen, Sämlinge, Protoplasten, Zellkulturen etc.. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Vermehrungsmaterial um Knollen und Samen.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von einem oder von mehreren fremden Nucleinsäuremolekül(en), das (die) ein Protein mit der enzymatischen Aktivität eines GBSSt-Proteins und ein Protein mit der enzymatischen Aktivität eines BE-Proteins codiert (codieren) oder die Verwendung von Fragmenten besagten Nucleinsäuremoleküls/besagter Nucleinsäuremoleküle, zur Herstellung von Pflanzen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von einem oder von mehreren fremden Nucleinsäuremolekül(en), das (die) ein Protein mit der enzymatischen Aktivität eines GBSSt-Proteins und ein Protein mit der enzymatischen Aktivität eines BE-Proteins codiert (codieren) oder die Verwendung von

Fragmenten besagten Nucleinsäuremoleküls/besagter Nucleinsäuremoleküle, zur Herstellung von Pflanzen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren, die im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden Pflanzen des waxy-Phänotyps einen erhöhten Phosphatgehalt und/oder eine verringerte Verkleisterungstemperatur aufweist.

Unter dem Begriff "Fragment(en)" soll in diesem Zusammenhang ein Teil des fremden Nucleinsäuremoleküls bzw. der fremden Nucleinsäuremoleküle verstanden werden, der beispielsweise für einen funktionell aktiven Teil der beschriebenen Proteine codieren kann. Ferner kann das Fragment auch für eine antisense- oder eine Cosuppressions-mRNA oder für ein Ribozym codieren. Bei der Verwendung der Fragmente ist zu beachten, daß nur solche Fragmente verwendet werden dürfen, die zu einer Verringerung der enzymatischen Aktivität eines GBSSt- und/oder eines BE- bzw. eines BEI-Proteins führen.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von einem oder von mehreren fremden Nucleinsäuremolekül(en) zur Herstellung von Pflanzen, die eine Stärke mit einem Amylopektin Gehalt von mindestens 90% synthetisieren, die im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden Pflanzen des waxy-Phänotyps einen erhöhten Phosphatgehalt und/oder eine verringerte Verkleisterungstemperatur aufweist, wobei das fremde Nucleinsäuremolekül ein Molekül ist oder die fremden Nucleinsäuremoleküle mehrere Moleküle sind, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- a) DNA-Molekülen, die mindestens eine antisense-RNA codieren, die eine Verringerung der Expression von endogenen, ein GBSSt-Protein und/oder ein BEI-Protein codierenden Genen, bewirken kann;
- b) DNA-Molekülen, die über einen Cosuppressionseffekt zu einer Verringerung der Expression von endogenen Genen, die ein GBSSt-Protein und/oder ein BEI-Protein codieren, führen
- c) DNA-Moleküle, die mindestens ein Ribozym codieren, das/die spezifisch Transkripte spalten kann von endogenen Genen, die ein GBSSt-Protein und/oder ein BEI-Protein codieren; und
- d) Mittels in vivo-Mutagenese eingeführte Nucleinsäuremoleküle, die zu einer Mutation oder einer Inscrtion einer heterologen Sequenz in einem endogenen, ein GBSSt-Protein und/oder ein BEI-Protein codierenden Gen führen, wobei die Mutation oder Inscrtion eine

Verringerung der Expression des GBSSI-Gens und/oder des BEI-Gens bewirkt, oder die Synthese eines inaktiven GBSSI-Proteins und/oder eines inaktiven BEI-Proteins.

Wie vorstehend bereits erläutert, können die fremden Nucleinsäuremoleküle zeitgleich oder auch nacheinander in das Genom der Pflanzenzelle eingeführt werden. Zeit- und kostensparender ist dabei die zeitgleiche Einführung der fremden Nucleinsäuremoleküle, d.h. die Cotransformation bei der vorzugsweise in einem Transformationsexperiment gemäß der oben beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren (ein) Nucleinsäuremolekül(e) in die Pflanzenzelle eingeführt wird, deren/dessen Vorhandensein und gegebenenfalls Expression zur Verringerung der Aktivität eines Proteins mit der Aktivität eines GBSSI-Proteins und zur Verringerung eines Proteins mit der Aktivität eines BE-Proteins, vorzugsweise eines BEI-Proteins, führt/führen. Daher betrifft die vorliegende Erfindung auch Zusammensetzungen, die mindestens eines der vorstehend beschriebenen Nucleinsäuremoleküle enthalten. Vorzugsweise führt deren Einführung in Pflanzenzellen zur Verringerung der Aktivität eines GBSSI-Proteins und zur Verringerung eines Proteins mit der Aktivität eines BE-Proteins, vorzugsweise eines BEI-Proteins. Dabei können in der erfindungsgemäßen Zusammensetzung die Nucleinsäuremoleküle, deren jeweiliges Vorhandensein in der Pflanzenzelle zur Verringerung der Aktivität eines GBSSI- und eines BE-Proteins, vorzugsweise eines BEI-Proteins, führen entweder getrennt oder zusammen in einem rekombinanten Nucleinsäuremolekül umfaßt sein. Im ersten Fall, kann die erfindungsgemäße Zusammensetzung beispielsweise zwei oder mehrere rekombinante Vektoren enthalten, deren gemeinsames Vorhandensein in der Pflanzenzelle zu dem besagten Phänotyp führen. Im zweiten Falle, der erfindungsgemäß bevorzugt wird, enthält ein rekombinantes Nucleinsäuremolekül die genetische Information, die zur Verringerung der Aktivität eines GBSSI- und eines BE-Proteins, vorzugsweise eines BEI-Proteins, führt. Beispielsweise können in einem solchen rekombinanten Nucleinsäuremolekül die vorstehend beschriebenen Nucleinsäuremoleküle, deren Vorhandensein in einer Pflanzenzelle zur Verringerung der Aktivität eines GBSSI- bzw. eines BE- oder BEI-Proteins führen, als ein chimäres Gen oder als getrennte Gene vorliegen. Beispiele für solche Doppel- oder Mehrfachkonstrukte sind in der Fachliteratur zahlreich beschrieben. Die vorgenannten rekombinanten Nucleinsäuremoleküle können in jeder beliebigen Wirtszelle vorliegen, die dadurch ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind. Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung solcher Doppel- oder Mehrfachkonstrukte ist, daß erfindungsgemäße Pflanzenzellen und Pflanzen leichter

identifiziert werden können, beispielsweise durch eine entsprechende Auswahl von PCR-Primern oder Southern blots. Daher sind die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen vorzugsweise durch das Vorhandensein solcher Doppel- oder Mehrfachkonstrukte gekennzeichnet.

Die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisieren aufgrund der Expression eines fremden Nucleinsäuremoleküls oder mehrerer fremder Nucleinsäuremoleküle, dessen/deren Vorhandensein oder dessen/deren Expression zur Verringerung der Aktivität eines GBSSI-Proteins und zur Verringerung der Aktivität eines BE-Proteins, vorzugsweise des BEI-Proteins, führt/führen im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyppflanzen, eine Stärke, die in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, insbesondere dem Amylose/Amylopektin-Verhältnis und/oder dem Phosphatgehalt und/oder dem Verkleisterungsverhalten im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke verändert ist.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher Stärke, die aus den erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen, Pflanzen sowie Vermehrungsmaterial erhältlich ist,

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung auch Stärken, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie einen Amylopektin Gehalt von mindestens 90% und einen im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden Pflanzen des waxy-Phänotyps um mindestens 30%, bevorzugt um mindestens 50 %, besonders bevorzugt um mindestens 75%, insbesondere um mindestens 100% erhöhten Phosphatgehalt im Vergleich zu Pflanzenzellen von entsprechenden Pflanzen des waxy-Phänotyps aufweisen.

Aufgrund des erhöhten Phosphatgehaltes weisen die erfindungsgemäßen Stärken gegenüber herkömmlichen waxy-Stärken den Vorteil auf, daß sie aufgrund ihrer veränderten physico-chemischen Eigenschaften für bestimmte Verwendungszwecke besser geeignet sind. Aufgrund des erhöhten Phosphatgehalts müssen die erfindungsgemäßen Stärken im Vergleich zu herkömmlichen waxy-Stärken hierfür nicht oder weniger stark nachträglich chemisch phosphoryliert werden.

Vorzugsweise unterscheiden sich die erfindungsgemäßen Stärken von chemisch phosphorylierten Monophosphat-waxy-Stärken in ihren strukturellen/funktionellen Eigenschaften.

Phosphorylierte waxy-Stärken eignen sich besonders zur Verwendung für alle Dickungen ohne Haut bzw. Gelbildung im Dessert, Feinkost- und Fertiggerichtbereich vor allem auch für Tiefkühlterzeugnisse. In technischen Bereichen werden Monostärkephosphate teilweise zur Papierherstellung, außerdem als Schlichte-, Flockungs- und Flotationsmittel sowie als Waschmittelzusatz verwendet.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung auch Stärken, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie einen Amylopektingehalt von mindestens 90%, einen im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden Pflanzen des waxy-Phänotyps um mindestens 30% erhöhten Phosphatgehalt und/oder eine verringerte Verkleisterungstemperatur T aufweisen.

Der Begriff "verringerte Verkleisterungstemperatur" soll in diesem Zusammenhang wie bereits oben definiert verstanden werden.

Im Zusammenhang mit bestimmten Anwendungen und technischen Prozessen erlaubt eine verringerte Verkleisterungstemperatur die Einsparung von Wärmeenergie und/oder eine vereinfachte Prozeßführung.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung Stärken aus Kartoffelpflanzen, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie einen Amylopektingehalt von mindestens 90%, einen im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden Pflanzen des waxy-Phänotyps um mindestens 30% erhöhten Phosphatgehalt und/oder eine verringerte Verkleisterungstemperatur T aufweisen.

Naive Kartoffelstärken zeigen im Vergleich zu nativen Stärken von Mais, Reis- oder Weizenpflanzen einen erhöhten Phosphatgehalt, was sie für bestimmte Anwendungen prädestiniert. Überraschenderweise ist es mit Hilfe des erfindungsgemäßen Ansatzes möglich, den Phosphatgehalt von waxy-Kartoffelstärken weiter zu steigern, so daß die erfindungsgemäßen Kartoffelstärken im Vergleich zu Kartoffelstärken von entsprechenden Wildtyppflanzen und/oder im Vergleich zu entsprechenden Kartoffelpflanzen des waxy-Phänotyps einen um mindestens 30%, bevorzugt um mindestens 50%, besonders bevorzugt um mindestens 75% und insbesondere von mindestens 100% erhöhten Phosphatgehalt

aufweisen. Ferner besitzen Kartoffelstärken gegenüber Cerealiestärken (z.B. Weizen, Hafer, Mais, Reis) den Vorteil, daß sie einen geringen Gehalt an Lipiden und Proteinen aufweisen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die Kartoffelstärken gekennzeichnet durch einen Amylopektingehalt von mindestens 93%, besonders bevorzugt von mindestens 95% und insbesondere bevorzugt von mindestens 97% und/oder durch einen im Vergleich zu Stärke aus Pflanzenzellen von entsprechenden Pflanzen des waxy-Phänotyps um mindestens 30%, bevorzugt um mindestens 50%, besonders bevorzugt um mindestens 75%, insbesondere um mindestens 100% erhöhten Phosphatgehalt im Vergleich zu Pflanzenzellen von entsprechenden Pflanzen des waxy-Phänotyps und/oder durch eine im Vergleich zu Stärke aus Pflanzenzellen von entsprechenden Pflanzen des waxy-Phänotyps um mindestens 0,5°C, bevorzugt um mindestens 1,5°C, besonders bevorzugt um mindestens 3°C und insbesondere bevorzugt um mindestens 5°C verringerte Verkleisterungstemperatur.

Die Begriffe "Phosphatgehalt" und "Verkleisterungstemperatur" werden in diesem Zusammenhang in gleicher Weise wie bereits oben beschrieben definiert.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus einer oben beschriebenen erfindungsgemäßen Pflanze(zelle) und/oder aus stärke-speichernden Teilen einer solchen Pflanze. Vorzugsweise umfaßt ein solches Verfahren auch den Schritt des Erntens der kultivierten Pflanzen und/oder stärke-speichernder Teile dieser Pflanzen vor der Extraktion der Stärke und besonders bevorzugt ferner den Schritt der Kultivierung erfindungsgemäßer Pflanzen vor dem Ernten. Verfahren zur Extraktion der Stärke von Pflanzen oder von stärke-speichernden Teilen von Pflanzen sind dem Fachmann bekannt. Weiterhin sind Verfahren zur Extraktion der Stärke aus verschiedenen anderen stärke-speichernden Pflanzen beschrieben, z. B. in "Starch: Chemistry and Technology (Hrsg.: Whistler, BeMiller und Paschall (1994), 2. Ausgabe, Academic Press Inc. London Ltd. ISBN 0-12-746270-8; siehe z. B. Kapitel XII, Seite 412-468: Mais und Sorghum-Stärken: Herstellung; von Watson; Kapitel XIII, Seite 469-479: Tapioca-, Arrowroot- und Sagostärken: Herstellung; von Corbishley und Miller; Kapitel XIV, Seite 479-490: Kartoffelstärke: Herstellung und Verwendungen; von Knight; Kapitel XV, Seite 491 bis 506: Weizenstärke: Herstellung, Modifizierung und Verwendungen; von Knight und Oson; und Kapitel XVI, Seite 507 bis 528: Reisstärke: Herstellung und Verwendungen; von Rohmer und Klem; Maissstärke: Eckhoff et al., Cereal

Chem. 73 (1996) 54-57, die Extraktion von Maissstärke im industriellen Maßstab wird in der Regel durch das sogenannte "wet milling" erreicht.). Vorrichtungen, die für gewöhnlich bei Verfahren zur Extraktion von Stärke von Pflanzematerial verwendet werden, sind Separatoren, Dekanter, Hydrocyclone, Sprührockner und Wirbelschichtrockner.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner Stärke, die durch das oben beschriebene erfindungsgemäße Verfahren erhältlich ist.

Die erfindungsgemäßen Stärken können nach dem Fachmann bekannten Verfahren nachträglich modifiziert werden und eignen sich in unmodifizierter oder modifizierter Form für verschiedene Verwendungen im Nahrungsmittel- oder Nicht-Nahrungsmittelbereich.

Grundsätzlich läßt sich die Einsatzmöglichkeit der Stärke in zwei große Bereiche unterteilen.

Der eine Bereich umfaßt die Hydrolyseprodukte der Stärke, hauptsächlich Glucose und Glucanbausteine, die über enzymatische oder chemische Verfahren erhalten werden. Sie dienen als Ausgangsstoff für weitere chemische Modifikationen und Prozesse, wie Fermentation. Für eine Reduktion der Kosten kann hierbei die Einfachheit und kostengünstige Ausföhrung eines Hydrolyseverfahrens von Bedeutung sein. Gegenwärtig verläuft es im wesentlichen enzymatisch unter Verwendung von Amyloglucosidase. Vorstellbar wäre eine Kosteneinsparung durch einen geringeren Einsatz von Enzymen. Eine Strukturveränderung der Stärke, z.B. Oberflächenvergrößerung des Korns, leichtere Verdaulichkeit durch geringeren Verzweigungsgrad oder eine sterische Struktur, die die Zugänglichkeit für die eingesetzten Enzyme begrenzt, könnte dies bewirken.

Der andere Bereich, in dem die Stärke wegen ihrer polymeren Struktur als sogenannte native Stärke verwendet wird, gliedert sich in zwei weitere Einsatzgebiete:

#### 1. Nahrungsmittelindustrie

Stärke ist ein klassischer Zusatzstoff für viele Nahrungsmittel, bei denen sie im wesentlichen die Funktion des Bindens von wäßrigen Zusatzstoffen übernimmt bzw. eine Erhöhung der Viskosität oder aber eine erhöhte Gelbildung hervorruft. Wichtige Eigenschaftsmerkmale sind das Fließ- und Sorptionsverhalten, die Quell- und Verkleisterungstemperatur, die Viskosität und Dickungsleistung, die Löslichkeit der Stärke, die Transparenz und Kleistersstruktur, die Hitze-, Scher- und Säurestabilität, die Neigung zur Retrogradation, die Fähigkeit zur Filmbildung, die Gefrier/Taustabilität,

die Verdaulichkeit sowie die Fähigkeit zur Komplexbildung mit z.B. anorganischen oder organischen Ionen.

#### 2. Nicht-Nahrungsmittelindustrie

In diesem großen Bereich kann die Stärke als Hilfsstoff für unterschiedliche Herstellungsprozesse bzw. als Zusatzstoff in technischen Produkten eingesetzt. Bei der Verwendung der Stärke als Hilfsstoff ist hier insbesondere die Papier- und Pappeindustrie zu nennen. Die Stärke dient dabei in erster Linie zur Retardation (Zurückhaltung von Feststoffen), der Abbindung von Füllstoff- und Feinstoffteilchen, als Festigungsstoff und zur Entwässerung. Darüber hinaus werden die günstigen Eigenschaften der Stärke in bezug auf die Steifigkeit, die Härte, den Klang, den Griff, den Glanz, die Glätte, die Spaltfestigkeit sowie die Oberflächen ausgenutzt.

##### 2.1 Papier- und Pappeindustrie

Innerhalb des Papierherstellungsprozesses sind vier Anwendungsbereiche, nämlich Oberfläche, Strich, Masse und Spritzen, zu unterscheiden.

Die Anforderungen an die Stärke in bezug auf die Oberflächenbehandlung sind im wesentlichen ein hoher Weißgrad, eine angepaßte Viskosität, eine hohe Viskositätsstabilität, eine gute Filmbildung sowie eine geringe Staubbildung. Bei der Verwendung im Strich spielt der Feststoffgehalt, eine angepaßte Viskosität, ein hohes Bindevermögen sowie eine hohe Pigmentaffinität eine wichtige Rolle. Als Zusatz zur Masse ist eine rasche, gleichmäßige, verlustfreie Verteilung, eine hohe mechanische Stabilität und eine vollständige Zurückhaltung im Papierfluß von Bedeutung. Beim Einsatz der Stärke im Spritzbereich sind ebenfalls ein angepaßter Feststoffgehalt, hohe Viskosität sowie ein hohes Bindevermögen von Bedeutung.

##### 2.2 Klebstoffindustrie

Ein großer Einsatzbereich der Stärken besteht in der Klebstoffindustrie, wo man die Einsatzmöglichkeiten in vier Teilbereiche gliedert: die Verwendung als reinem Stärkелеin, die Verwendung bei mit speziellen Chemikalien aufbereiteten Stärkелеinen, die Verwendung von Stärke als Zusatz zu synthetischen Harzen und Polymerdispersionen sowie die Verwendung von Stärken als Streckmittel für synthetische Klebstoffe. 90 % der Klebstoffe auf Stärkebasis werden in den Bereichen

Wellpappenherstellung, Herstellung von Papierstücken, Beuteln und Tüten, Herstellung von Verbundmaterialien für Papier und Aluminium, Herstellung von Kartons und Wiederbefuchungsleim für Briefumschläge, Briefmarken usw. eingesetzt.

## 2.3 Textil- und Textilpflegemittelindustrie

Ein großes Einsatzfeld für die Stärken als Hilfsmittel und Zusatzstoff ist der Bereich Herstellung von Textilien und Textilpflegemitteln. Innerhalb der Textilindustrie sind die folgenden vier Einsatzbereiche zu unterscheiden: Der Einsatz der Stärke als Schlichtmittel, d.h. als Hilfstoff zur Glättung und Stärkung des Kleilverhaltens zum Schutz gegen die beim Weben angreifenden Zugkräfte sowie zur Erhöhung der Abriebfestigkeit beim Weben. Stärke als Mittel zur Textilaufstufung vor allem nach qualitätsverschlechternden Vorbehandlungen, wie Bleichen, Färben usw., Stärke als Verdickungsmittel bei der Herstellung von Farbpasten zur Verhinderung von Farbstoffdiffusionen sowie Stärke als Zusatz zu Kettungsmitteln für Nähgarne.

## 2.4 Baustoffindustrie

Der vierte Einsatzbereich ist die Verwendung der Stärken als Zusatz bei Baustoffen. Ein Beispiel ist die Herstellung von Gipskartonplatten, bei der die im Gipsstreifen vermischte Stärke mit dem Wasser verkleistert, an die Oberfläche der Gipsplatte diffundiert und dort den Karton an die Platte bindet. Weitere Einsatzbereiche sind die Beimischung zu Putz- und Mineralfasern. Bei Transportbeuten werden Stärkeprodukte zur Verzögerung der Abbindung eingesetzt.

## 2.5 Bodenstabilisation

Ein weiterer Markt für die Stärke bietet sich bei der Herstellung von Mitteln zur Bodenstabilisation an, die bei künstlichen Erdbewegungen zum temporären Schutz der Bodenpartikel gegenüber Wasser eingesetzt werden. Kombinationsprodukte aus der Stärke und Polymeremulsionen sind nach heutiger Kenntnis in ihrer Erosions- und verkunstungsmindernden Wirkung den bisher eingesetzten Produkten gleichzusetzen, liegen preislich aber deutlich unter diesen.

## 2.6 Einsatz bei Pflanzenschutz- und Düngemitteln

Ein Einsatzbereich liegt bei der Verwendung der Stärke in Pflanzenschutzmitteln zur Veränderung der spezifischen Eigenschaften der Präparate. So kann die Stärke zur Verbesserung der Benetzung von Pflanzenschutz- und Düngemitteln, zur dosierten Freigabe der Wirkstoffe, zur Umwandlung flüssiger, flüchtiger und/oder unlöslicher Wirkstoffe in mikrokristalline, stabile, formbare Substanzen, zur Mischung inkompatibler Verbindungen und zur Verlängerung der Wirkdauer durch Verminderung der Zersetzung eingesetzt werden.

## 2.7 Pharmaka, Medizin und Kosmetikindustrie

Ein weiteres Einsatzgebiet besteht im Bereich der Pharmaka, Medizin und Kosmetikindustrie. In der pharmazeutischen Industrie kann die Stärke als Bindemittel für Tabletten oder zur Bindemittelverdünnung in Kapseln eingesetzt werden. Weiterhin kann die Stärke als Tablettenpressungsmittel dienen, da sie nach dem Schlucken Flüssigkeit absorbieren und nach kurzer Zeit soweit quellen, daß der Wirkstoff freigesetzt wird. Medizinische Glee- und Wundpuder basieren aus qualitativen Gründen auf Stärke. Im Bereich der Kosmetik werden Stärken beispielsweise als Träger von Puderzusatzstoffen, wie Düften und Salicylsäure eingesetzt. Ein relativ großer Anwendungsbereich für die Stärke liegt bei Zahnpasta.

## 2.8 Stärkezusatz zu Kohlen und Briquets

Einen Einsatzbereich bietet die Stärke als Zusatzstoff zu Kohle und Briquet. Kohle kann mit einem Stärkezusatz quantitativ hochwertig agglomeriert bzw. briquetiert werden, wodurch ein frühzeitiges Zerfallen der Briquets verhindert wird. Der Stärkezusatz liegt bei Grillkohle zwischen 4 und 6 %, bei kalorierter Kohle zwischen 0,1 und 0,5 %. Des weiteren gewinnen Stärken als Bindemittel an Bedeutung, da durch ihren Zusatz zu Kohle und Briquet der Ausstoß schädlicher Stoffe deutlich vermindert werden kann.

## 2.9 Erz- und Kohleschlammreinigung

Die Stärke kann ferner bei der Erz- und Kohleschlammreinigung als Flockungsmittel eingesetzt werden.

## 2.10 Gießereihilfsstoff

Ein weiterer Einsatzbereich besteht als Zusatz zu Gießereihilfsstoffen. Bei verschiedenen Gießverfahren werden Kerne benötigt, die aus Bindemittel-verseztten Sanden hergestellt werden. Als Bindemittel wird heute überwiegend Bentonit eingesetzt, das mit modifizierten Stärken, meist Quellstärken, versetzt ist.

Zweck des Stärkezusatzes ist die Erhöhung der Fließfestigkeit sowie die Verbesserung der Bindefestigkeit. Darüber hinaus können die Quellstärken weitere produktionstechnische Anforderungen, wie im kalten Wasser dispergierbar, rehydratisierbar, gut in Sand mischbar und hohes Wasserbindungsvermögen, aufweisen.

## 2.11 Einsatz in der Kautschukindustrie

In der Kautschukindustrie kann die Stärke zur Verbesserung der technischen und optischen Qualität eingesetzt werden. Gründe sind dabei die Verbesserung des Oberflächenglanzes, die Verbesserung des Griffs und des Aussehens, dafür wird Stärke vor der Kaltvulkanisation auf die klebrigen gummierten Flächen von Kautschukstoffen gestreut, sowie die Verbesserung der Bedruckbarkeit des Kautschuks.

## 2.12 Herstellung von Lederersatzstoffen

Eine weitere Absatzmöglichkeit der modifizierten Stärken besteht bei der Herstellung von Lederersatzstoffen.

## 2.13 Stärke in synthetischen Polymeren

Auf dem Kunststoffsektor zeichnen sich folgende Einsatzgebiete ab: die Einbindung von Stärkefolgeprodukten in den Verarbeitungsprozess (Stärke ist nur Füllstoff, es besteht keine direkte Bindung zwischen synthetischem Polymer und Stärke) oder alternativ die Einbindung von Stärkefolgeprodukten in die Herstellung von Polymeren (Stärke und Polymer gehen eine feste Bindung ein).

Die Verwendung der Stärke als reinem Füllstoff ist verglichen mit den anderen Stoffen wie Talkum nicht wettbewerbsfähig. Anders sieht es aus, wenn die spezifischen Stärkeeigenschaften zum Tragen kommen und hierdurch das Eigenschaftsprofil der Endprodukte deutlich verändert wird. Ein Beispiel hierfür ist die Anwendung von Stärkeprodukten bei der Verarbeitung von Thermoplasten, wie Polyethylen. Hierbei werden

die Stärke und das synthetische Polymer durch Koexpression im Verhältnis von 1 : 1 zu einem 'master batch' kombiniert, aus dem mit granuliertem Polyethylen unter Anwendung herkömmlicher Verfahrenstechniken diverse Produkte hergestellt werden. Durch die Einbindung von Stärke in Polyethylenfolien kann eine erhöhte Stoffdurchlässigkeit bei Hohlkörpern, eine verbesserte Wasserdampfdurchlässigkeit, ein verbessertes Antistatverhalten, ein verbessertes Antiblockverhalten sowie eine verbesserte Bedruckbarkeit mit wäßrigen Farben erreicht werden.

Eine andere Möglichkeit ist die Anwendung der Stärke in Polyurethanschäumen. Mit der Adaption der Stärkederivate sowie durch die verfahrenstechnische Optimierung ist es möglich, die Reaktion zwischen synthetischen Polymeren und den Hydroxygruppen der Stärken gezielt zu steuern. Das Ergebnis sind Polyurethanfolien, die durch die Anwendung von Stärke folgende Eigenschaftsprofile erhalten: eine Verringerung des Wärmeausdehnungskoeffizienten, Verringerung des Schrumpfverhaltens, Verbesserung des Druck/Spannungsverhaltens, Zunahme der Wasserdampfdurchlässigkeit ohne Veränderung der Wasseraufnahme, Verringerung der Entflammbarkeit und der Aufblährate, kein Abtropfen brennbarer Teile, Halogenfreiheit und verminderte Alterung. Nachteile, die gegenwärtig noch vorhanden sind, sind verringerte Druckfestigkeit sowie eine verringerte Schlagfestigkeit.

Die Produktentwicklung beschränkt sich inzwischen nicht mehr nur auf Folien. Auch feste Kunststoffprodukte, wie Töpfe, Platten und Schalen, sind mit einem Stärkegehalt von über 50 % herzustellen. Des Weiteren sind Stärke/ Polymernmischungen günstig zu beurteilen, da sie eine sehr viel höhere biologische Abbaubarkeit aufweisen.

Außerordentliche Bedeutung haben weiterhin auf Grund ihres extremen Wasserbindungsvermögens Stärkepfropfpolymerisate gewonnen. Dies sind Produkte mit einem Rückgrat aus Stärke und einer nach dem Prinzip des Radikalkettenmechanismus aufgepfropften Seitengliedern eines synthetischen Monomers. Die heute verfügbaren Stärkepfropfpolymerisate zeichnen sich durch ein besseres Binde- und Rückhaltevermögen von bis zu 1000 g Wasser pro g Stärke bei hoher Viskosität aus. Die Anwendungsbereiche für diese Supersorbter haben sich in den letzten Jahren stark ausgeweitet und liegen im Hygienebereich mit Produkten wie Windeln und Unterlagen sowie im landwirtschaftlichen Sektor, z.B. bei Saatgutpflanzungen.



Entscheidend für den Einsatz der neuen, gentechnisch veränderten Stärken sind zum einen die Struktur, Wassergehalt, Proteingehalt, Lipidgehalt, Fasergehalt, Asche/Phosphatgehalt, Amylose/Amylopektinverhältnis, Molmassenverteilung, Verzweigungsgrad, Korngröße und -form sowie Kristallinität, zum anderen auch die Eigenschaften, die in folgende Merkmale münden: Fließ- und Sorptionsverhalten, Verkleisterungstemperatur, Viskosität, Dickungsleistung, Löslichkeit, Kleisterstruktur und -transparenz, Hitze-, Scher- und Säurestabilität, Retrogradationsneigung, Gelbildung, Gefrier-/Taufstabilität, Komplexbildung, Jodbindung, Filmbildung, Klebekraft, Enzymstabilität, Verdaulichkeit und Reaktivität.

Die Erzeugung modifizierter Stärken mittels gentechnischer Eingriffe in einer transgenen Pflanze kann zum einen die Eigenschaften der aus der Pflanze gewonnenen Stärke dahingehend verändern, daß weitere Modifikationen mittels chemischer oder physikalischer Verfahren nicht mehr notwendig erscheinen. Zum anderen können die durch gentechnische Verfahren veränderte Stärken weiteren chemischen und/oder physikalischen Modifikationen unterworfen werden, was zu weiteren Verbesserungen der Qualität für bestimmte der oben beschriebenen Einsatzgebiete führt. Diese chemischen und physikalischen Modifikationen sind grundsätzlich bekannt. Insbesondere handelt es sich dabei um Modifikationen durch:

- Hitzebehandlung,
- Säurebehandlung,
- Erzeugung von Stärkeethern
  - Stärke-Alkylether, O-Allyl ether, Hydroxylalkylether,
  - O-Carboxylmethylether, N-haltige Stärkeether, P-haltige Stärkeether, S-haltige Stärkeether
- Erzeugung von vernetzten Stärken
- Erzeugung von Stärke-Pfropf-Polymerisaten
- Oxidation und
- Veresterungen, welche zur Entstehung von Phosphat-, Nitrat-, Sulfat-, Xanthat-, Acetat- und Citratstärken führen. Weitere organische Säuren können ebenfalls zur Veresterung eingesetzt werden.

Die Figuren zeigen:

Figur 1: Schematische Darstellung eines RVA-Profiles

In den Beispielen wurden die folgenden Methoden verwendet:

#### 1. Starkeanalytik

##### a) Bestimmung des Amylose/Amylopektinverhältnisses

Stärke wurde nach Standardmethoden aus Karstoffpflanzten isoliert, und das Verhältnis Amylose zu Amylopektin wurde nach der von Hovenkamp-Hermelink et al. beschriebenen Methode (Potato Research 31, (1988), 241-246) bestimmt.

##### b) Bestimmung des Phosphatgehaltes

In der Stärke können die Positionen C2, C3 und C6 der Glukoseeinheiten phosphoryliert sein. Zur Bestimmung des Phosphatgruppengehaltes an C6-Position wurden 100 mg Stärke in 1 ml 0,7 M HCl für 4 Stunden bei 95°C hydrolysiert (Nielsen et al., Plant Physiol. 105, (1994), 11-117). Nach Neutralisation mit 0,7 M KOH wurden zur Glukose-6-Phosphat-Bestimmung 50 ml des Hydrolysat einem optisch-enzymatischen Test unterzogen. Die Änderung der Absorption des Testansatzes (100 mM Imidazol/HCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,4 mM NAD; 2 units Glukose-6-phosphat-dehydrogenase aus Leuconosoc mesenteroides; 30°C) wurde bei 334 nm verfolgt.

Die Bestimmung des Gesamphosphatgehaltes erfolgte nach der Methode von Ames (Methods in Enzymology VIII, (1966), 115-118).

Es werden ca. 50 mg Stärke mit 30 µl ethanolischer Magnesiumnitrat-Lösung versetzt und drei Stunden bei 500°C im Muffelofen verascht. Der Rückstand wird mit 300 µl 0,5 M Salzsäure versetzt und 30 min bei 60°C inkubiert. Anschließend wird ein Aliquot auf 300 µl 0,5 M Salzsäure aufgefüllt, zu einer Mischung aus 100 µl 10%iger Ascorbinsäure und 600 µl 0,42% Ammoniummolybdat in 2 M Schwefelsäure gegeben und 20 min bei 45°C inkubiert.

Es folgt eine photometrische Bestimmung bei 820nm unter Berücksichtigung einer Phosphat-Eichreihe als Standard.

##### c) Bestimmung der Gelfestigkeit (Texture Analyser)

2 g Stärke (TS) werden in 25 ml H<sub>2</sub>O verkleistert (vgl. RVA) und anschließend für 24 h luftdicht verschlossen bei 25°C gelagert. Die Proben werden unter der Sonde (runder

Stempel) eines Texture Analysers TA-XT2 der Firma Stable Micro Systems fixiert und die Gelfestigkeit mit folgenden Parametern bestimmt:

- Test-Geschwindigkeit	0,5 mm/s
- Eindringtiefe	7 mm
- Kontaktfläche	113 mm <sup>2</sup>
- Druck	2 g

#### d) Viskositätsprofil

2 g Stärke (TS) werden in 25 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen und für die Analyse in einem Rapid Visco Analyser (Newport Scientific Pty Ltd, Investmet Support Group, Warriewood NSW 2102, Australien) verwendet. Der Betrieb des Gerätes erfolgt nach den Angaben des Herstellers. Zur Bestimmung der Viskosität der wäßrigen Lösung der Stärke wird die Stärkesuspension zunächst von 50°C auf 95°C erhitzt, mit einer Geschwindigkeit von 12°C pro Minute. Anschließend wird die Temperatur für 2,5 Min bei 95°C gehalten. Danach wird die Lösung von 95°C auf 50°C abgekühlt, mit einer Geschwindigkeit von 12°C pro Minute. Während der gesamten Dauer wird die Viskosität bestimmt. Die Bestimmung der Verkleisterungstemperatur erfolgt über die Steigung der Viskositätskurve in Abhängigkeit von der Zeit. Wird die Steigung der Kurve größer als 1,2 (dieser Wert wird vom Benutzer vorgegeben), identifiziert das Computerprogramm die zu diesem Zeitpunkt gemessene Temperatur als Verkleisterungstemperatur.

#### e) Bestimmung von Glukose, Fruktose und Saccharose

Die Bestimmung des Gehaltes von Glukose, Fruktose und Saccharose erfolgt nach der von Stitt et al. (Methods in Enzymology 174, (1989), 518-552 beschriebenen Methode.

#### f) Analyse der Seitenkettenverteilung des Amylopektins

Die Seitenkettenverteilung bzw. Vorbereitung wird bestimmt wie in Lloyd *et al.*, Biochem. J. 338, (1999), 515-521 beschrieben. Es werden folgende Elutionsbedingungen gewählt:

Zeit	0,15 M NaOH	1 M NaAc	in 0,15M NaOH
min	%	%	%

0	100	0	
5	100	0	
20	85	15	
35	70	30	
45	68	32	
60	0	100	
70	0	100	
72	100	0	
80	100	0	

#### g) Korngrößenbestimmung

Die Korngrößenbestimmung wurde mit einem Fotosedimentometer des Typs "Lumosed" der Firma Reich GmbH, Deutschland durchgeführt.

Die Korngrößenverteilung wurde in wäßriger Lösung bestimmt und erfolgte nach Herstellerangaben sowie basierend auf der Literatur von z.B. H. Pitsch, Korngrößenbestimmung, LABO-1988/3 Fachzeitschrift für Labortechnik, Darmstadt

#### h) Wasserbindevormögen

Zur Bestimmung des Wasserbindevormögens wurde der Rückstand nach der Abtrennung des löslichen Anteils durch Zentrifugation der bei 70°C gequollenen Stärke gewogen. Das Wasserbindevormögen (WBV) der Stärke wurde auf die um die lösliche Masse korrigierte Stärkeeinwaage bezogen.

$$WBV \left( \frac{g}{g} \right) = \frac{(\text{Rückstand} - (\text{Einwaage} - \text{löslicher Anteil}))}{(\text{Einwaage} - \text{löslicher Anteil})}$$

In den Beispielen wurden folgende Vektoren verwendet:

#### Angaben zum Vektor pBinAR-Hyg

Das Plasmid pBinAR ist ein Derivat des binären Vektorplasmids pBin19 (Bevan, 1984), das folgendermaßen konstruiert wurde:

ein 529 bp langes Fragment, das die Nukleotide 6909-7437 des 35S-Promotor des Blumenkohl-Mosaik-Virus umfaßt, wurde als *EcoR* I/*Kpn* I-Fragment aus dem Plasmid pDH51 (Pietrzak et al. 1986) isoliert und zwischen die *EcoR* I- und *Kpn* I-Schnittstellen des Polylinkers von pUC18 ligiert. Dabei entstand das Plasmid pUC18-35S. Aus dem Plasmid pAGV40 (Herrera-Estrella et al. 1983) wurde mit Hilfe der Restriktionsendonucleasen *Hind* III und *Pvu* II ein 192 bp langes Fragment isoliert, das das Polyadenylierungssignal (3'-Ende) des *Ocropsin Synthase*-Gens (Gen 3) der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al. 1984) umfaßt (Nukleotide 11749-11939). Nach Addition von *Sph* I-Linkern an die *Pvu* II-Schnittstelle wurde das Fragment zwischen die *Sph* I- und *Hind* III-Schnittstellen von pUC18-35S ligiert. Daraus resultierte das Plasmid pA7. Ausgehend vom Plasmid pA7 wurde das *Eco* RI-*Hind* III Fragment enthaltend den 35S RNA-Promotor, den *ocs*-Terminator sowie den zwischen 35S RNA-Promotor und *ocs*-Element gelegenen Teil des Polylinkers in das entsprechend geschnittene pBIB-Hyg-Plasmid (Becker, 1990) ligiert.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung:

#### Beispiel 1

**Herstellung transgener Kartoffelpflanzen, die eine verringerte Aktivität eines GBSSI- und eines BEI-Proteins aufweisen**

Zur Erzeugung transgener Pflanzen, die eine verringerte Aktivität eines GBSSI- und eines BEI-Proteins aufweisen, wurden zunächst transgene Pflanzen erzeugt, die eine verringerte GBSSI-Aktivität aufwiesen. Zu diesem Zwecke wurde die T-DNA des Plasmids pB33aGBSSI-Kan mit Hilfe von Agrobakterien, wie bei Roch-Sosa et al. (EMBO J. 8, (1989), 23-29) beschrieben, in Kartoffelpflanzen transferiert.

Zur Konstruktion des Plasmids pB33aGBSSI-Kan wurde das *DraII/DraI* Fragment aus der Promotorregion des Patatin Klasse I Gens B33 von *Solanum tuberosum*, umfassend die Nukleotide -1512 bis +14 (Rocha-Sosa et al., (1989), s.o.) wurde in die *SmaI* Schnittstelle des Plasmids pUC19 (Genbank Acc. No. M77789) ligiert. Aus dem entstandenen Plasmid wurde das Promotorfragment als *EcoRI/HindIII* Fragment in die *polylinker* Region des Plasmids

pBin19 (Beyan et al., Nucl Acids Res 11, (1983), 369-385) ligiert. Anschließend wurde das 3'EcoRI Fragment, Nukleotide +1181 bis +2511 des GBSSI-Gens aus *Solanum tuberosum* (Hengersberg, Molekulare Analyse des *waxy* Gens aus *Solanum tuberosum* und Expression von *waxy* antiserne RNA in Kartoffeln, Dissertation Universität zu Köln (1988)) in die *EcoRI* Schnittstelle des entstandenen Plasmids ligiert. Es resultierte das Plasmid pB33aGBSSI-Kan.

Nach der Transformation wurden verschiedene Linien transgener Kartoffelpflanzen identifiziert, die einen deutlich verringerten Gehalt der mRNA einer GBSSI und einer verringerten Aktivität des GBSSI-Proteins aufwiesen. Ferner synthetisieren derartige Pflanzen eine Stärke mit einem Amylopektin Gehalt von mindestens 90%.

Anschließend wurden zwei unabhängige Linien dieser Amylopektin-synthetisierenden Pflanzen mit dem Plasmid p35SABEI-Hyg transformiert. Zur Konstruktion dieses Plasmides wurde ein ca. 3000 bp langes *SmaI/HindIII*-Fragment, enthaltend eine partielle cDNA für das BEI-Enzym aus Kartoffel (Kossmann, Klonierung und funktionelle Analyse von Genen codierend für am Kohlenhydratstoffwechsel der Kartoffel beteiligte Proteine, Dissertation Technische Universität Berlin, (1992)) wurde geglättet und in "anti-sense"-Orientierung bezüglich des 35S-Promotors in die *SmaI*-Schnittstelle des Vektors pBinAR-Hyg (s.o.) eingeführt.

Nach der Supertransformation wurden verschiedene unabhängige Linien identifiziert, die zwar die gleichen T-DNAs, aber an unterschiedlichen Orten im Genom integriert, enthalten, die sowohl eine verringerte GBSSI-Aktivität als auch eine signifikant verringerte Menge an BEI-mRNA aufwiesen. Es wurden Pflanzen selektiert, die im Vergleich zu entsprechenden Wildtyppflanzen eine um vorzugsweise mindestens 95% reduzierte Enzymaktivität des GBSSI-Proteins und eine um mindestens 90% reduzierte Enzymaktivität des BEI-Proteins aufwiesen. Die Stärken dieser Pflanzen wurden anschließend analysiert.

#### Beispiel 2

**Analyse der Stärke von Pflanzen mit verringerter GBSSI- und BEI-Aktivität**

Die von dem gemäß Beispiel 1 hergestellten transgenen Kartoffelpflanzen gebildete Stärke unterscheidet sich z.B. von in Wildtyppflanzen synthetisierter Stärke in ihrem Phosphat- oder Amylosegehalt und in den mittels RVA bestimmten Viskositäts- und

Verkleisterungseigenschaften. Die Ergebnisse der physico-chemischen Charakterisierung der modifizierten Stärken sind in Tabelle 1 (Tab.1) dargestellt.

Patentansprüche

- 1. Transgene Pflanzenzelle, die genetisch modifiziert ist, wobei die genetische Modifikation zur Verringerung der Aktivität eines endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden GBSSI-Proteins und zur Verringerung der Aktivität eines endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden BE-Proteins führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyppflanzen.
- 2. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 1, wobei die genetische Modifikation in der Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls oder mehrerer fremder Nucleinsäuremoleküle besteht, dessen/deren Vorhandensein oder dessen/deren Expression zur Verringerung der Aktivität eines GBSSI-Proteins und zur Verringerung der Aktivität eines BE-Proteins führt/führen im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyppflanzen.
- 3. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 2, wobei das Vorhandensein oder die Expression des fremden Nucleinsäuremoleküls oder der fremden Nucleinsäuremoleküle zur Inhibierung der Expression endogener Gene führt/führen, die ein GBSSI-Protein und die ein BE-Protein codieren.
- 4. Transgene Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 2 oder 3, wobei das fremde Nucleinsäuremolekül ein Molekül ist oder die fremden Nucleinsäuremoleküle mehrere Moleküle sind, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
  - a) DNA-Molekülen, die mindestens eine antisense-RNA codieren, die eine Verringerung der Expression von endogenen, ein GBSSI-Protein und/oder ein BE-Protein codierenden Genen, bewirken kann;
  - b) DNA-Molekülen, die über einen Cosuppressionseffekt zu Verringerung der Expression von endogenen Genen, die ein GBSSI-Protein und/oder ein BE-Protein codieren, führen;
  - c) DNA-Moleküle, die mindestens ein Ribozym codieren, das/die spezifisch Transkripte spalten kann von endogenen Genen, die ein GBSSI-Protein und/oder ein BE-Protein codieren; und
  - d) Mittels in vivo-Mutagenese eingeführte Nucleinsäuremoleküle, die zu einer Mutation oder einer Insertion einer heterologen Sequenz in einem endogenen, ein GBSSI-Protein und/oder ein BE-Protein codierenden Gen führen, wobei die Mutation oder Insertion eine Verringerung der Expression des GBSSI-Gens und/oder

Nr.	Genotyp	Phosphat in C6 (%)	Gesamt-phosphat (%)	Amylose (%)	RVA Max (%)	RVA Min (%)	RVA Fin (%)	RVA Set (%)	RVA T (%)	Gelbstärke (%)
1	Desiree (Wildtyp)	100	100	22	100	100	100	100	100	100
2	asGBSSI	110	119	<4	70	90	84	57	104	21
3	asGBSSI-asBEI	181	189	<4	69	84	78	51	102	21

Tab. 1

Legende:

GBSSI= granule bound starch synthase1

BEI= branching enzyme 1

as= antisense

RVA= Rapid Visco Analyzer

Max= maximale Viskosität

Min= minimale Viskosität

Fin= Viskosität am Ende der Messung

Set= Setback= Differenz aus Min und Fin

T= Verkleisterungstemperatur

Die %-Werte sind mit Ausnahme des Amylosegehaltes auf den Wildtyp (=100%) bezogen.

des BE-Gens bewirkt, oder die Synthese eines inaktiven GBSSI-Proteins und/oder eines inaktiven BE-Proteins.

5. Transgene Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das BE-Protein ein BEI-Protein und/oder das BE-Gen ein BEI-Gen ist.
6. Transgene Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 5, die eine modifizierte Stärke synthetisiert.
7. Transgene Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 6, die eine modifizierte Stärke mit einem Amylopektin Gehalt von mindestens 90% enthält und im Vergleich zu Stärke aus Pflanzenzellen von entsprechenden Pflanzen des waxy-Phänotyps einen erhöhten Phosphatgehalt aufweist.
8. Transgene Pflanze enthaltend Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 7.
9. Transgene Pflanze nach Anspruch 8, die eine stärke speichernde Pflanze ist.
10. Transgene Pflanze nach Anspruch 9, die eine Kartoffelpflanze ist.
11. Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanze, die eine modifizierte Stärke synthetisiert, wobei
  - a) eine pflanzliche Zelle genetisch modifiziert wird durch die Einführung eines oder mehrerer fremder Nucleinsäuremolekül(s), deren/dessen Vorhandensein oder deren/dessen Expression zur Verringerung der Aktivität eines Proteins mit der Aktivität eines GBSSI-Proteins und zur Verringerung der Aktivität eines Proteins mit der Aktivität eines BE-Proteins führt/führen;
  - b) aus der gemäß a) hergestellten Zelle eine Pflanze regeneriert wird; undaus der gemäß Schritt b) erzeugten Pflanze gegebenenfalls weitere Pflanzen erzeugt werden.
12. Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanze, deren Stärke einen Amylopektin Gehalt von mindestens 90% und einen erhöhten Phosphatgehalt im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden Pflanzen des waxy-Phänotyps aufweist, wobei
  - a) eine pflanzliche Zelle genetisch modifiziert wird durch die Einführung eines oder mehrerer fremder Nucleinsäuremolekül(s), deren/dessen Vorhandensein oder deren/dessen Expression zur Verringerung der Aktivität eines Proteins mit der Aktivität eines GBSSI-Proteins und zur Verringerung der Aktivität eines Proteins mit der Aktivität eines BEI-Proteins führt/führen;
  - b) aus der gemäß a) hergestellten Zelle eine Pflanze regeneriert wird; und

aus der gemäß Schritt b) erzeugten Pflanze gegebenenfalls weitere Pflanzen erzeugt werden.

13. Transgene Pflanze erhältlich durch das Verfahren nach Anspruch 11 oder 12.
14. Vermehrungsmaterial von Pflanzen nach einem der Ansprüche 8 bis 10 oder 13, wobei das Vermehrungsmaterial transgene Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 7 enthält.
15. Verwendung von einem oder von mehreren fremden Nucleinsäuremolekül(en), das (die) ein Protein mit der enzymatischen Aktivität eines GBSSI-Proteins und ein Protein mit der enzymatischen Aktivität eines BE-Proteins codiert (codieren) oder die Verwendung von Fragmenten besagten Nucleinsäuremoleküls/besagter Nucleinsäuremoleküle, zur Herstellung von Pflanzen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren.
16. Verwendung von einem oder von mehreren fremden Nucleinsäuremolekül(en), das (die) ein Protein mit der enzymatischen Aktivität eines GBSSI-Proteins und ein Protein mit der enzymatischen Aktivität eines BEI-Proteins codiert (codieren) oder Verwendung von Fragmenten besagten Nucleinsäuremoleküls/besagter Nucleinsäuremoleküle, zur Herstellung von Pflanzen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren, die im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden Pflanzen des waxy-Phänotyps einen erhöhten Phosphatgehalt und/oder eine verringerte Verkleisterungstemperatur aufweist.
17. Verwendung von einem oder von mehreren fremden Nucleinsäuremolekül(en) zur Herstellung von Pflanzen, die eine Stärke mit einem Amylopektin Gehalt von mindestens 90% synthetisieren, die im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden Pflanzen des waxy-Phänotyps einen erhöhten Phosphatgehalt und/oder eine verringerte Verkleisterungstemperatur aufweist, wobei das fremde Nucleinsäuremolekül ein Molekül ist oder die fremden Nucleinsäuremoleküle mehrere Moleküle sind, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
  - a) DNA-Molekülen, die mindestens eine antisense-RNA codieren, die eine Verringerung der Expression von endogenen, ein GBSSI-Protein und/oder ein BEI-Protein codierenden Genen, bewirken kann;
  - b) DNA-Molekülen, die über einen Cosuppressionseffekt zu einer Verringerung der Expression von endogenen Genen, die ein GBSSI-Protein und/oder ein BEI-Protein codieren, führen.

c) DNA-Moleküle, die mindestens ein Ribozym codieren, das/die spezifisch Transkriptspe-  
sarten kann von endogenen Genen, die ein GBSSI-Protein und/oder ein BEI-Protein  
codieren; und

d) Mittels in vivo-Mutagenese eingeführte Nucleinsäuremoleküle, die zu einer Mutation  
oder einer Insertion einer heterologen Sequenz in einem endogenen, ein GBSSI-  
Protein und/oder ein BEI-Protein codierenden Gen führen, wobei die Mutation oder  
Insertion eine Verringerung der Expression des GBSSI-Gens und/oder des BEI-Gens  
bewirkt, oder die Synthese eines inaktiven GBSSI-Proteins und/oder eines inaktiven  
BEI-Proteins.

18. Zusammensetzung enthaltend mindestens eines der in den Ansprüchen 1 bis 17 definierten  
Nucleinsäuremoleküle.

19. Zusammensetzung nach Anspruch 18, wobei das Vorhandensein des/der  
Nucleinsäuremolekül(e) in Pflanzenzellen zur Verringerung der Aktivität eines endogenen  
in der Pflanzenzelle vorkommenden GBSSI-Proteins und zur Verringerung der Aktivität  
eines endogenen in der Pflanzenzelle vorkommenden BEI-Proteins führt(en).

20. Zusammensetzung nach Anspruch 19, wobei das BEI-Protein ein BEI-Protein ist.

21. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 18 bis 20, wobei das/die  
Nucleinsäuremolekül(e) in einem rekombinanten Nucleinsäuremolekül enthalten ist/sind.

22. Wirtszelle enthaltend eine Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 18 bis 20 oder  
ein rekombinantes Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 21.

23. Transgene Pflanzenzelle enthaltend die Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 18  
bis 21.

24. Stärke erhältlich aus Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 7 oder 23 oder  
Pflanzen nach einem der Ansprüche 8 bis 10 oder 13.

25. Stärke nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen Amylopektin Gehalt von  
mindestens 90% und einen im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden Pflanzen des  
waxy-Phänotyps um mindestens 30% erhöhten Phosphat Gehalt aufweist.

26. Stärke nach einem der Ansprüche 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen  
Amylopektin Gehalt von mindestens 90%, einen im Vergleich zu Stärke aus  
entsprechenden Pflanzen des waxy-Phänotyps um mindestens 30% erhöhten  
Phosphat Gehalt und/oder eine um mindestens 1,0°C verringerte  
Verkleisterungstemperatur aufweist.

27. Stärke nach einem der Ansprüche 24 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus  
Kartoffeln stammt.

28. Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke nach einem der Ansprüche 24 bis 27  
umfassend die Extraktion der Stärke aus einer Pflanze nach einem der Ansprüche 8 bis 10  
oder 13.

29. Stärke erhältlich durch ein Verfahren nach Anspruch 28.

## Zusammenfassung

Es werden transgene Pflanzenzellen und Pflanzen beschrieben, die eine im Vergleich zu Wildtyppflanzellen und -pflanzen modifizierte Stärke synthetisieren. Die beschriebenen Pflanzenzellen und Pflanzen zeigen eine Verringerung der Aktivität eines GBSS1- und eines BE-Proteins. Ferner werden modifizierte Stärken beschrieben sowie Verfahren zu deren Herstellung.

## RVA-Profil

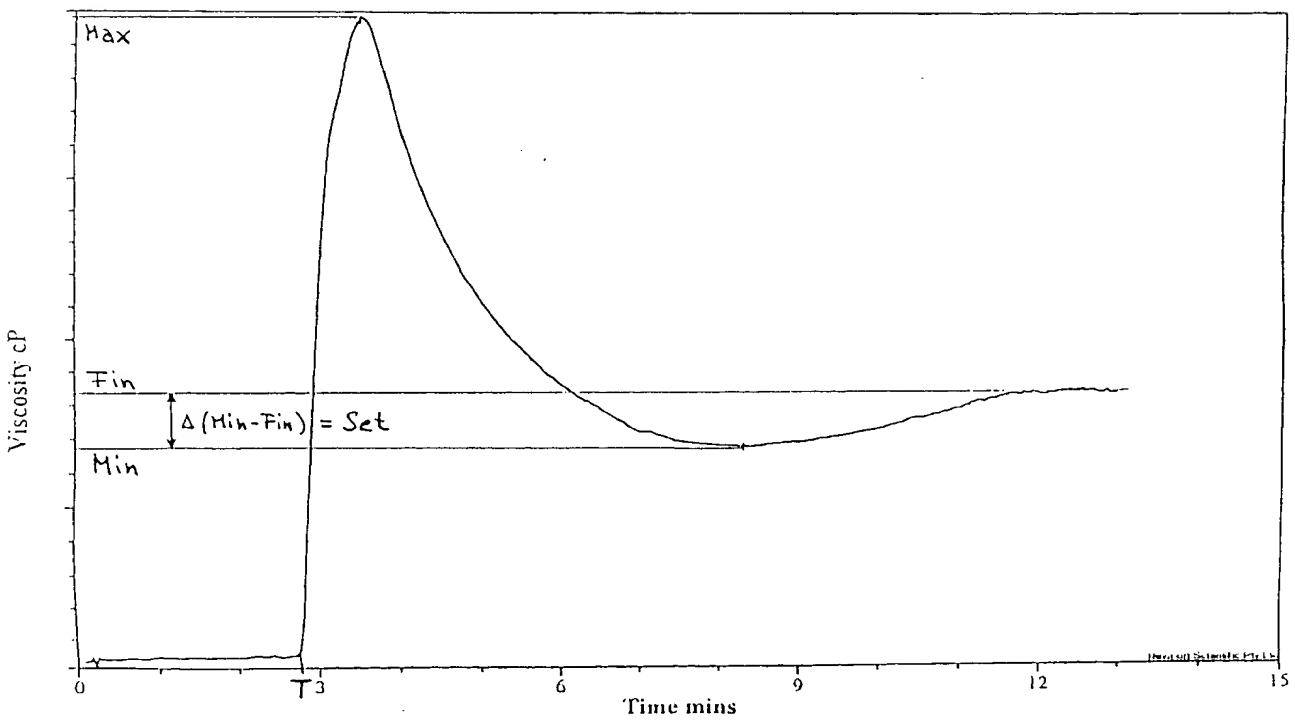


Fig. 1